

**O OBESOGÊNICO CLORETO DE TRIBUTILESTANHO
PROVOCA ANORMALIDADES NA FUNÇÃO DO EIXO
HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-GONADAL PELA
DESREGULAÇÃO NA SINALIZAÇÃO DE
KISSPEPTIN/LEPTINA EM RATAS WISTAR**

GABRIELA CAVATI SENA

Doutorado em Ciências Fisiológicas

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Vitória
2017**

O OBESOGÊNICO CLORETO DE TRIBUTILESTANHO PROVOCA ANORMALIDADES NA FUNÇÃO DO EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-GONADAL PELA DESREGULAÇÃO NA SINALIZAÇÃO DE *KISSPEPTIN*/LEPTINA EM RATAS WISTAR

Tese apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Dr. Jones Bernardes Graceli.

GABRIELA CAVATI SENA

Doutorado em Ciências Fisiológicas

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Vitória
2017**




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DA CANDIDATA AO
TÍTULO DE DOUTORA PELO PPGCF/CCS/UFES


N.º Matrícula do^(a) Candidato^(a): 2013141125

A Comissão Julgadora que examinou a Tese de Doutorado, intitulada "**O Obesogênico Cloreto de Tributilestanho Provoca Anormalidades na Função do Eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Gonadal pela Desregulação na Sinalização de Kisspeptin/Leptina em Ratas Wistar**", apresentada e defendida publicamente pela aluna **Gabriela Cavati Sena**, no dia 14 de março de 2017, às 09h00, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de Doutorado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

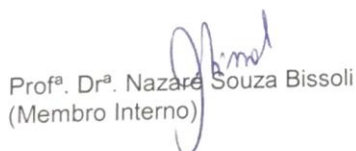
Vitória – ES, 14 de março de 2017.


Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli
(Orientador)


Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto
(Membro Externo)


Prof. Dr. Leonardo dos Santos
(Membro Interno)


Prof. Dr. Leandro Ceotto Freitas Lima
(Membro Externo)


Profª. Drª. Nazare Souza Bissoli
(Membro Interno)

Observação: Documento de tramitação interna da Ufes. Não é comprobatório de conclusão de curso.
Av. Marechal Campos 1468, Vitória - ES 29040-090 - Brasil.
Tel.: 0XX(27) 3335-7340 Fax: 3335-7330

GABRIELA CAVATI SENA

**O OBESOGÊNICO CLORETO DE TRIBUTILESTANHO
PROVOCA ANORMALIDADES NA FUNÇÃO DO EIXO
HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-GONADAL PELA
DESREGULAÇÃO NA SINALIZAÇÃO DE
KISSPEPTIN/LEPTINA EM RATAS WISTAR**

Tese apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 14 de Março de 2017,

Banca Examinadora

Dr^a Nazaré Souza Bissoli (PPGCF UFES)

Dr. Leonardo dos Santos (PPGCF UFES)

Dr. Henrique Futuro Neto (EMESCAN)

Dr. Leandro Ceotto Freitas Lima (Pós Doutorando)

Dr. Jones Bernardes Graceli (PPGCF UFES) (Orientador)

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

Sena, Gabriela Cavati, 1987 -

S474o O obesogênico cloreto de tributilestanho provoca anormalidades na
função do eixo hipotalâmico-hipofisário- gonadal pela desregulação na
sinalização de kisspeptin/leptina em ratas wistar / Gabriela Cavati Sena –
2017.
90 f. : il.

Orientador: Jones Bernardes Graceli.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Obesidade. 2. Leptina. I. Graceli, Jones Bernardes. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 612

AGRADECIMENTOS

*A **Jeová**, por me proteger, abençoar e dar forças.*

*A **minha mãe**, meu tudo.*

*Aos **familiares e amigos** queridos que tanto me deram incentivo durante essa etapa da vida profissional além de suporte emocional e afetivo.*

Aos amigos do meu laboratório, companheiros em momentos bons e ruins.

Aos colegas de pesquisa que me ajudaram com tanta presteza e carinho.

Ao meu orientador. Por me guiar durante todos esses anos.

Aos professores que abriram suas portas e colaboraram para que esta tese pudesse ser concluída.

RESUMO

Cloreto de Tributilestanho (TBT) é um xenobiótico usado como biocida em tintas anti-incrustantes que induz efeitos perturbadores no sistema endócrino, tais como obesidade e anomalias reprodutivas. Investigamos se os distúrbios metabólicos estão correlacionados com a função anormal do eixo (HHG) e com a ação da kisspeptina. Um controle metabólico integrado do eixo HHG foi exercido pela leptina. No entanto, os estudos que investigam os efeitos obesogênicos do TBT no eixo HHG são especialmente raros. Ratas Wistar foram tratadas com veículo e TBT (100 ng/ kg/dia) durante 15 dias via gavagem. Analisamos seus efeitos sobre a acumulação de estanho no soro e no ovário (biomarcador da exposição ao TBT), ciclicidade estral, níveis de LH, expressão de GnRH, ação de kisspeptina, fertilidade, níveis de testosterona, apoptose ovariana, inflamação uterina, fibrose, ganho de peso, insulina, leptina, níveis de adiponectina, testes de tolerância à glicose (TTG) e de sensibilidade à insulina (TSI). O TBT levou ao aumento dos níveis de estanho sérico e ovariano, ciclicidade estral irregular, diminuição dos níveis de LH, redução da expressão de GnRH e responsividade à kisspeptina. Observou-se forte correlação negativa entre os níveis de estanho e a menor resposta à kisspeptina e expressão de mRNA do GnRH em ratas TBT. Aumento nos níveis de testosterona, fibrose ovariana e uterina, apoptose ovariana, inflamação uterina, diminuição da fertilidade e do *feedback* negativo de estrogênio foram demonstrados em ratas TBT. Também foram identificados: aumento do ganho de peso corporal, TTG e TSI anormais, associados à hiperinsulinemia, hiperleptinemia e hipoadiponectinemia. TBT interrompeu o bom funcionamento do eixo HHG em resultado da ação anormal da kisspeptina. As disfunções metabólicas co-ocorrem com as anormalidades do eixo HHG. A hiperleptinemia como resultado da obesidade induzida por TBT pode estar associada à função anormal de HHG. Observou-se forte correlação negativa entre a hiperleptinemia e a menor responsividade à kisspeptina em TBT. Estes achados fornecem evidências de que o TBT causa efeitos tóxicos diretos no eixo HHG e /ou indiretamente por regulação metabólica anormal do eixo.

Palavras-chave: Cloreto de tributilestanho, desreguladores endócrinos químicos, eixo HHG, kisspeptina, obesidade, Leptina.

ABSTRACT

Tributyltin chloride (TBT) is a xenobiotic used as a biocide in antifouling paints that has been demonstrated to induce endocrine-disrupting effects, such as obesity and reproductive abnormalities. We investigated whether metabolic disorders as a result of TBT are correlated with abnormal hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis function, as well as kisspeptin action. An integrative metabolic control in the HPG axis was exerted by leptin. However, studies that investigate the obesogenic TBT effects on the HPG axis are especially rare. Female Wistar rats were administered vehicle and TBT (100 ng/kg/day) for 15 days via gavage. We analyzed their effects on the tin serum and ovary accumulation (as biomarker of TBT exposure), estrous cyclicity, surge LH levels, GnRH expression, kisspeptin action, fertility, testosterone levels, ovarian apoptosis, uterine inflammation, fibrosis, estrogen negative feedback, body weight gain, insulin, leptin, adiponectin levels, as well as the glucose tolerance (GTT) and insulin sensitivity tests (IST). TBT led to increased serum and ovary tin levels, irregular estrous cyclicity, and decreased surge LH levels, GnRH expression and kisspeptin responsiveness. A strong negative correlation between the serum and ovary tin levels with lower kisspeptin responsiveness and GnRH mRNA expression was observed in TBT rats. An increase in the testosterone levels, ovarian and uterine fibrosis, ovarian apoptosis, and uterine inflammation and a decrease in fertility and estrogen negative feedback were demonstrated in TBT rats. We also identified: an increase in the body weight gain and abnormal GTT and IST tests, which were associated with hyperinsulinemia, hiperleptinemia and hypoadiponectinemia. TBT disrupted proper functioning of the HPG axis as a result of abnormal kisspeptin action. The metabolic dysfunctions co-occur with the HPG axis abnormalities. Hyperleptinemia as a result of obesity induced by TBT may be associated with abnormal HPG function. A strong negative correlation between the hyperleptinemia and lower kisspeptin responsiveness was observed in the TBT rats. These findings provide evidence that TBT leads toxic effects direct on the HPG axis and/ or indirectly by abnormal metabolic regulation of the axis.

Keywords: Tributyltin chloride, endocrine-disrupting chemicals, HPG axis, kisspeptin, obesity, leptin.

LISTA DE FIGURAS

Introdução:

Figura 1 - Fórmula estrutural química do tributilestanho (TBT) - R_3SnX19

Figura 2 – Diagrama que ilustra o efeito da inibição da enzima aromatase mediada por triorganoestanho, induzindo o imposex.....23

Figura 3 - Esquematização dos mecanismos de *feedback* positivo e negativo exercidos por esteróides ovarianos na regulação de *Kiss1* ao longo do eixo HHG.....32

Figura 4 - Hipótese testada no presente trabalho.....33

Métodos:

Figura 1 – Desenho experimental do trabalho.....35

Resultados:

Figura 1 – Dosagem de estanho (Sn) no soro e no ovário de ratas CON e TBT.....44

Figura 2A – As ratas TBT têm ciclo estral anormal.....45

Figura 2B – Representação gráfica do número de dias em cada estágio do ciclo e da duração (comprimento) total do ciclo.....	46
Figura 2C – Níveis séricos de LH basal e durante o pico hormonal.....	47
Figura 2D – Análise RT-qPCR para determinar expressão de mRNA do GnRH hipotalâmico.	47
Figura 2E – Teste de estimulação com GnRH.....	48
Figura 2F – Teste de estimulação com kisspeptina.....	49
Figura 3 – A fertilidade foi prejudicada em TBT.....	50
Figura 3.1 – (B): Representação gráfica do número de ninhadas ao longo de 90 dias. (C): Representação gráfica da razão número de filhotes por ninhada.....	51
Figura 4 – Representações gráficas (A): do peso ovariano. (B): dos níveis séricos de testosterona. (C): dos níveis séricos de estrogênio.....	51
Figura 4.1 – Cortes ovarianos corados com H&E.....	52
Figura 4.2 – Cortes ovarianos.....	53

Figura 5 – Anatomia, morfologia e inflamação do útero em ratas.....	54
Figura 5.1 – Cortes histológicos de úteros.....	55
Figura 6 – Resultados da avaliação da expressão das proteínas dos receptores ER α e ER β	57
Figura 7 – Redução do <i>feedback</i> negativo de estrogênio em ratas TBT.....	59
Figura 8 – Adiposidade e peso do tecido adiposo branco (TAB).....	61
Figura 9 – Parâmetros metabólicos das ratas.....	62

LISTA DE SIGLAS

ARC	Núcleo arqueado
AVPV	Núcleo periventricular anteroventral
CL	Corpo Lúteo
CON	Grupo controle
DBT	Dibutilestanho
END	Endométrio
EPM	Erro padrão da média
ERs	Receptores nucleares de estrogênio
ER α	Receptor nuclear de estrogênio alfa
ER β	Receptor nuclear de estrogênio beta
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
H&E	Hematoxilina e eosina
HHG	Eixo Hipotalâmico-hipofisário-gonadal
IMO	Organização Marítima Internacional
LH	Hormônio luteinizante
MBT	Monobutilestanho
M-D	Metaestro-Diestro
MIO	Miométrio

MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
NAG	n-acetil- β -D-glicosaminidase
NCR	Conselho Nacional de Pesquisa
OT	Organoestânico
OTs	Organoestânicos
OVX	Ovariectomia
PVC	Cloreto de polivinila
PRs	Receptores nucleares de progesterona
PR-A	Receptor nuclear de progesterona A
PR-B	Receptor nuclear de progesterona B
Sn	Estanho inorgânico
Sn-C	Ligações estanho-carbono
TBT	Tributilestanho / grupo TBT
TBTCl	Cloreto de tributilestanho
TBTOH	Hidróxido de tributilestanho
TPT	Trifenilestanho
TSI	Teste de sensibilidade à insulina
TTG	Teste de tolerância à glicose

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
MÉTODOS.....	35
3.1 Desenho experimental.....	35
3.2 Químicos	35
3.3 Animais experimentais.....	35
3.4 Dosagem de estanho	36
3.5 Avaliação do ciclo estral.....	36
3.6 Ensaios hormonais	37
3.7 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR).....	38
3.8 Avaliação da fertilidade.....	39
3.9 Análise morfométrica	39
3.10 Avaliação da deposição de colágeno	40
3.11 Apoptose ovariana e ensaios de proliferação	40
3.12 Avaliação da atividade de NAG e MPO	40
3.13 Western blotting (Immunoblotting)	41
3.14 Avaliação do <i>feedback</i> negativo por esteróides sexuais	42
3.15 Análise metabólica.....	42
3.16 Testes de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina	42
3.17 Análise estatística	43
RESULTADOS.....	44
4.1 Acumulação de estanho	44
4.2 Ciclos estrais anormais	44
4.3 Baixos níveis de LH basal e de pico.....	46

4.4 Reduzida expressão de mRNA do GnRH hipotalâmico	46
4.5 Menor responsividade de GnRH.....	48
4.6 Baixa resposta à kisspeptina	49
4.7 Deficiências na fertilidade.....	50
4.8 Alterações ovarianas e hormonais	51
4.9 Corpos lúteos e fibrose ovariana	52
4.10 Apoptose e células PCNA positivas.....	53
4.11 Atrofia, inflamação e fibrose uterina.....	54
4.12 Regulação anormal de ER α e ER β	56
4.13 <i>Feedback</i> negativo do estrogênio anormal.....	58
4.14 Prejuízos no estado metabólico.....	60
4.15 Hiperinsulinemia, hiperleptinemia e hipoadiponectinemia.....	60
4.16 Resposta anormal aos TTG e TSI.....	60
DISCUSSÃO	63
REFERÊNCIAS	71

INTRODUÇÃO

A maior amostra do poder desordenado do homem em transformar o ambiente natural é a polarização política e econômica de amplas regiões, formando-se assim os grandes centros urbanos. A partir desta disposição, o aumento das atividades industriais, da agricultura intensiva e da movimentação portuária, por exemplo, têm causado degradação ambiental, diminuindo a oferta de recursos naturais saudáveis e por consequência, gerando crises energéticas e financeiras (WATANABE et al., 2002). Assim, os ecossistemas marinhos recebem constantemente enormes quantidades de contaminantes orgânicos e inorgânicos provenientes de efluentes industriais e domésticos, da contaminação indireta de rios, da precipitação atmosférica e da lixiviação dos solos (MORAES et al., 2001).

Ainda que a extensão do oceano possa gerar a ideia de que poluentes podem se diluir suficientemente para eliminar seus impactos, sabe-se, no entanto, que os contaminantes alteraram os ecossistemas marinhos. Animais são afetados em seu *habitat* natural, provocando alterações morfológicas e funcionais, modificando seu comportamento ecológico e reprodutivo. Ou seja, todos os parâmetros relacionados à sua biodiversidade são alterados, reduzindo assim sua adaptação ao meio e causando danos letais (KOVALCHUCK et al., 1998; GODOI et al., 2003).

Nos últimos cinquenta anos, observa-se uma preocupação crescente em relação à poluição dos ecossistemas marinhos. Tal preocupação é demonstrada por meio de acordos internacionais criados com o objetivo de prevenir e o controlar a poluição. A “Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição por Navios” de 1973 e seu protocolo de 1978, conhecido como MARPOL 73/78, na qual a Comissão de Engenharia e Sistemas Técnicos do Conselho Nacional de Pesquisa (NRC); sob cuidados do Comitê de Navegação realizou uma avaliação abrangente da implementação do anexo “lixo oceânico” em seu protocolo. O objetivo foi desenvolver uma estratégia para promover e obrigar o cumprimento do referido anexo pelos navios de superfície em todos os setores marítimos, promovendo a eliminação da poluição oceânica nos Estados Unidos da América (National Research Council [NRC], 1995).

Apesar da melhora sensível obtida com a adoção de algumas medidas preventivas, ficou claro que o crescimento de atividades pesqueiras e portuárias continuou associado a impactos negativos ao redor da zona costeira, colocando em risco os ecossistemas marinhos. O resultado da falta de planejamento adequado para impactos ambientais resultou em uma degradação da qualidade de vida da população animal e humana local (WATANABE et al., 2002). O maior risco ambiental para esses ecossistemas continuou sendo a poluição proveniente de fontes difusas e até mesmo pouco investigadas, tais como metais pesados, agrotóxicos, petróleo e seus derivados, biocidas anti-incrustantes (LUDGATE, 1987; MORON et al., 2006; MOREIRA et al., 2017).

O uso de compostos com propriedades anti-incrustantes pela industrial naval foi justificado pelo prejuízo econômico causado pela bioincrustação marinha. Tal processo natural ocorre através de colonização e crescimento de uma grande diversidade de organismos (como algas, bactérias, fungos, mexilhões e esponjas) em superfícies submersas, como os cascos de navio (OMAE, 2003). A bioincrustação produz no casco uma superfície irregular que acarreta o aumento de atrito e resistência, com consequente diminuição da velocidade de navegação, o que gera maior consumo de combustível e em paralelo promove a corrosão do casco das embarcações (KOTRIKLA, 2009). Para inibir tal processo, iniciou-se o uso de tintas anti-incrustantes com atividade biocida, aplicadas em toda e qualquer superfície metálica submersa em água do mar, como plataformas e cascos de embarcações de passeio e comerciais (YEBRA et al., 2004).

No início do século XX, os óxidos de zinco e de cobre foram os primeiros compostos utilizados regularmente em tintas anti-incrustantes, conhecidas como tintas de primeira geração (GODOI et al., 2003; FERNANDEZ; PINHEIRO, 2007). Havia um problema em relação à durabilidade dessas tintas, que se restringia ao máximo de 1 ano após sua aplicação. Em razão da rápida perda da eficiência, desenvolveu-se, em 1961, a primeira tinta anti-incrustante à base de um composto organoestânico (OT).

Esses compostos químicos sintéticos, pertencem a uma classe de poluentes organometálicos constituídos por um átomo de estanho (Sn). O Sn isolado não é propriamente tóxico, mas por estar ligado covalentemente a um ou mais substitutos orgânicos (hidrocarbonetos), apresentam padrões tóxicos complexos nos diferentes modelos animais (HOCH, 2001).

Os efeitos tóxicos dos organoestânicos (OTs) dependem então da natureza e do número de grupos orgânicos associados ao átomo de Sn. Apresentam a fórmula geral R_nSnX_{4-n} , onde **R** é um grupo **alquila** (radical orgânico monovalente formado pela remoção de um átomo de hidrogênio de um hidrocarboneto saturado) ou **arila** (radical orgânico derivado de um anel aromático, como o fenil e o benzil); **X** é uma espécie aniônica, como **cloreto**, **óxido**, **hidróxido** ou outro grupo funcional; e **n** varia de **1** a **4** (Figura 1). O número de ligações estanho-carbono (Sn-C) tem um grande efeito sobre as propriedades dos OTs. Cabe mencionar que sua ação tóxica máxima ocorre na série de OTs trissubstituídos ou triorganoestânicos (quando $n=3$), como o tributilestanho (TBT) e/ou o trifenilestanho (TPT). Tal fato pode ser explicado, em parte, devido à habilidade destes compostos em se associar ou penetrar o núcleo hidrofóbico de membranas fosfolipídicas, alterando a fluidez das membranas e desregulando a estrutura de suas proteínas associadas (GRÜN, 2014). Compostos mono e dissustituídos tais como monobutilestanho (MBT) e dibutilestanho (DBT) apresentam níveis de toxicidade ainda pouco compreendidos. Já os compostos tetrasubstituídos não possuem ação biocida considerável (HOCH, 2001; GODOI et al., 2003).

Por causa de suas cadeias orgânicas, os compostos OTs são hidrofóbicos, apresentando baixa solubilidade em água, sendo que sua solubilidade depende de fatores como o pH, a força iônica e a temperatura (FENT, 1996; HOCH, 2001). Em solução aquosa, a forma iônica do TBT encontra-se em equilíbrio com as formas TBTOH (hidróxido de tributilestanho) e TBTCl (cloreto de tributilestanho). No ambiente marinho em condições normais de pH (aproximadamente 8,5) e salinidade, o TBT encontra-se principalmente na forma TBTOH, sendo que sua biodisponibilidade se torna maior sob tal forma, quando o pH é maior que 8 (ALZIEU, 1998; FENT, 1996; RUDEL, 2003).

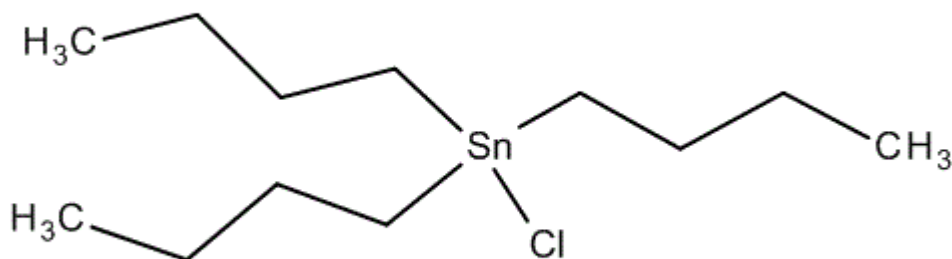


Figura 1 – Fórmula estrutural química do tributilestanho (TBT) - R_3SnX . Neste caso a espécie aniônica associada X é o cloro, ou seja, o composto é o cloreto de tributilestanho (TBTCl). Fonte: <http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Cloreto-de-tributiltina>.

O uso dos OTs como biocidas surgiu de um estudo, realizado na década de 1950, sobre a ação desses compostos em fungos, bactérias, vermes parasitas, caramujos aquáticos e insetos, conduzido pelo Conselho Internacional de Pesquisas sobre Tintas, no Instituto de Química Orgânica em Utrecht. Alguns anos mais tarde, as tintas conhecidas como de segunda geração, foram amplamente comercializadas e utilizavam como princípio ativo o TBT ou TPT. Na década de 1980, chegaram a revestir 90% dos cascos dos navios em operação no mundo (FENT, 2003; FERNANDEZ; PINHEIRO, 2007). A preferência por essas tintas de segunda geração ocorreu em razão de sua grande eficiência e durabilidade. Por causa de sua utilização, o intervalo entre docagens aumentou de 1 para cerca de 7 anos. Assim, os custos de manutenção com as embarcações diminuíram significativamente, e o lucro das indústrias navais aumentou (HOCH, 2001; MENG et al., 2009).

Segundo Bennet (1996), mesmo existindo no mercado marítimo alternativas, como o chumbo, o óxido de cobre e o óxido de zinco, a constatada ação biocida dos OT, em especial a do TBT, o tornou o principal composto utilizado no mundo em tintas anti-incrustantes. Em 1990, o consumo de OTs era estimado em cerca de 35.000 toneladas por ano e no início dos anos 2000, estimativas já apontavam o aumento

da produção mundial de OTs, atingindo 50.000 toneladas por ano (GODOI et al., 2003; YEBRA et al., 2004; DELGADO FILHO et al., 2011).

Acreditava-se que o TBT fosse o biocida ideal. Devido sua fácil degradação, que pode ocorrer pelo uso de ácidos, ação de microalgas e bactérias presentes no ambiente marinho e pela luz ultravioleta, proveniente da radiação solar ao longo da coluna d'água (GADD, 2000; HOCH, 2001; OMAE, 2003).

A versatilidade na preparação de compostos OTs foi descrita por Hoch (2001), e tal fato pode explicar a aplicabilidade e o destaque destes compostos não somente na composição de tintas antivegetativas, mas em muitas outras áreas de grande importância econômica. Derivados de compostos OTs apresentam também poderosa ação estabilizante do cloreto de polivinila (PVC), muito utilizado pela indústria de plásticos. Como este polímero, sob efeito do calor ou da luz, é degradado, a expansão da indústria de plásticos em 1940 tornou conhecida a importância da utilização de compostos que inibissem essa degradação. Os compostos OTs foram então introduzidos para este propósito na produção de plásticos nos Estados Unidos no final dos anos 1940 e na Europa no início dos anos 1950 (GODOI et al., 2003).

Outra importante aplicação dos OTs a partir de 1960 foi na agricultura mundial. Fungicidas contendo estanho, por muitos anos, foram desenvolvidos e comercializados no mundo todo por indústrias químicas multinacionais (GODOI et al., 2003). Em 2004 ainda era possível ter acesso a fungicidas com estanho em sua composição, que é o caso do *Peropal*, da empresa Bayer AG, cuja folha de descrição de segurança que ainda está disponível *online* lista dentre as precauções para o homem e o ambiente: “*muito tóxico para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nefastos em longo prazo no ambiente aquático*” (BAYER CropScience, 2004).

Não demorou muito para que esses efeitos prejudiciais dos compostos OTs fossem relatados e comprovados. Organismos que não eram o alvo de ação do TBT começaram a sofrer diante de sua extrema toxicidade. Em 1975 na baía de Arcachon, uma região cercada por pequenos portos e marinas na França, a

produção de ostras começou a ser severamente afetada em resultado de problemas de desenvolvimento retardado dos indivíduos, seguido por uma completa lacuna na reprodução e o surgimento de anomalias na calcificação das conchas (ALZIEU, 1998; 2000).

Após estudos ecotoxicológicos serem conduzidos com a finalidade de comprovar o surgimento de anomalias associadas ao uso do TBT, mesmo que em diferentes níveis tróficos e modelos experimentais, as primeiras regulamentações adotadas para a utilização de OTs como biocidas nas tintas anti-incrustantes surgiram em 1982 pelo Ministério do Meio Ambiente Francês, e em seguida pelo Reino Unido em 1985, com a finalidade de reduzir seu uso (ALZIEU 1996; CHAMP, 2000).

Em estimativa não detalhada, chegou-se ao montante de 147 milhões de dólares referentes à receita perdida pela indústria da cultura de ostras na baía de Arcachon entre 1977 e 1983. O TBT proveniente de barcos de lazer nas vizinhanças do cultivo das ostras foi o principal biocida a ser apontado como agente causador deste efeito. A maior questão envolvia o fato de barcos pequenos ficarem muito tempo nos atracadouros e próximos da costa, assim o TBT se acumularia no sedimento. Devido ao impacto sobre a exploração dos recursos biológicos marinhos gerados por essa contaminação crônica, a questão foi dirigida às autoridades ambientais. Em consequência, a França foi o primeiro país a proibir o uso de tintas contendo OTs em redes de pesca e nos cascos de embarcações com menos de 25 metros de comprimento nas áreas de extensas culturas de ostra ao longo do canal inglês e da costa atlântica (ALZIEU, 2000).

Apesar da iniciativa francesa, a decisão de reduzir a utilização de tintas anti-incrustantes não foi generalizada, pois para a maioria das indústrias a importância econômica dessas tintas superava os prejuízos ambientais (LIU et al., 1997). O TBT chegou a ser apontado mais de uma vez como sendo o composto mais tóxico introduzido deliberadamente no meio aquático (FENT, 1996; GOLDBERG, 1986).

Muitas outras anormalidades ambientais, devido à exposição ao TBT, foram surgindo. Entretanto, ele ainda era visto com certa incredulidade a respeito de seu potencial tóxico. A continuidade na aplicação das tintas à base de TBT nas embarcações foi essencialmente justificada por argumentos tais como: diminuição da biota incrustante, a redução do risco de introdução de espécies exóticas que seriam transportadas nos cascos das embarcações, redução da frequência de docagem, economia de combustível e manutenção, redução nos níveis de emissão de dióxido de carbono e de enxofre (OMAE, 2003; ABEL, 2000).

Além disso, reduzir o uso e os impactos dessas tintas de segunda geração caracterizava um verdadeiro desafio, primeiro pelo fato de que em 1991, segundo dados da Organização Marítima Internacional (IMO, 1999), cerca de 80% dos barcos de grande porte de todo o mundo já estariam utilizando algum tipo destas tintas. E segundo, que na maioria das tintas anti-incrustantes disponíveis no mercado os OTs eram quimicamente associados a uma matriz acrílica solúvel e esse tipo de associação promovia taxas constantes de liberação dos biocidas ao longo do tempo, elevando assim a durabilidade dos revestimentos e de seus efeitos (ALMEIDA et al., 2007).

Depois dos efeitos observados nas culturas de ostras, vários estudos demonstraram os efeitos tóxicos dos compostos OTs, mesmo que em baixas concentrações, sobre outras espécies marinhas (BEAUMONT; NEWMAN, 1986). O efeito biológico mais significativo relacionado à exposição ao TBT foi chamado de “*imposex*”, ou seja, desenvolvimento sexual anormal, devido à desregulação endócrina, ocasionando uma sobreposição de órgãos genitais masculinos em fêmeas de gastrópodes (Figura 2). Nakanishi (2008) observou que o desenvolvimento do canal deferente em fêmeas pode interferir na função e na estrutura dos ovidutos. Além disso, o metabolismo hormonal sexual de indivíduos expostos ao TBT é afetado (SCHULTE-OEHLMANN et al., 1995; OEHLMANN et al., 1998). Por ser um fenômeno irreversível, provoca a esterilização dos animais, podendo até exterminar populações de espécies mais sensíveis (MATTHIESSEN et al., 1995; FENT, 1996; FERNANDEZ et al., 2005). O fato de o *imposex* acarretar uma masculinização notória diante do desenvolvimento

de pseudo-pênis e canal deferente em fêmeas de espécies afetadas, tornam-nas excelentes bioindicadoras de contaminação por TBT em ecossistemas marinhos (SHI et al., 2005; COSTA et al., 2008; DELGADO FILHO et al., 2010; GRACELI et al., 2012).

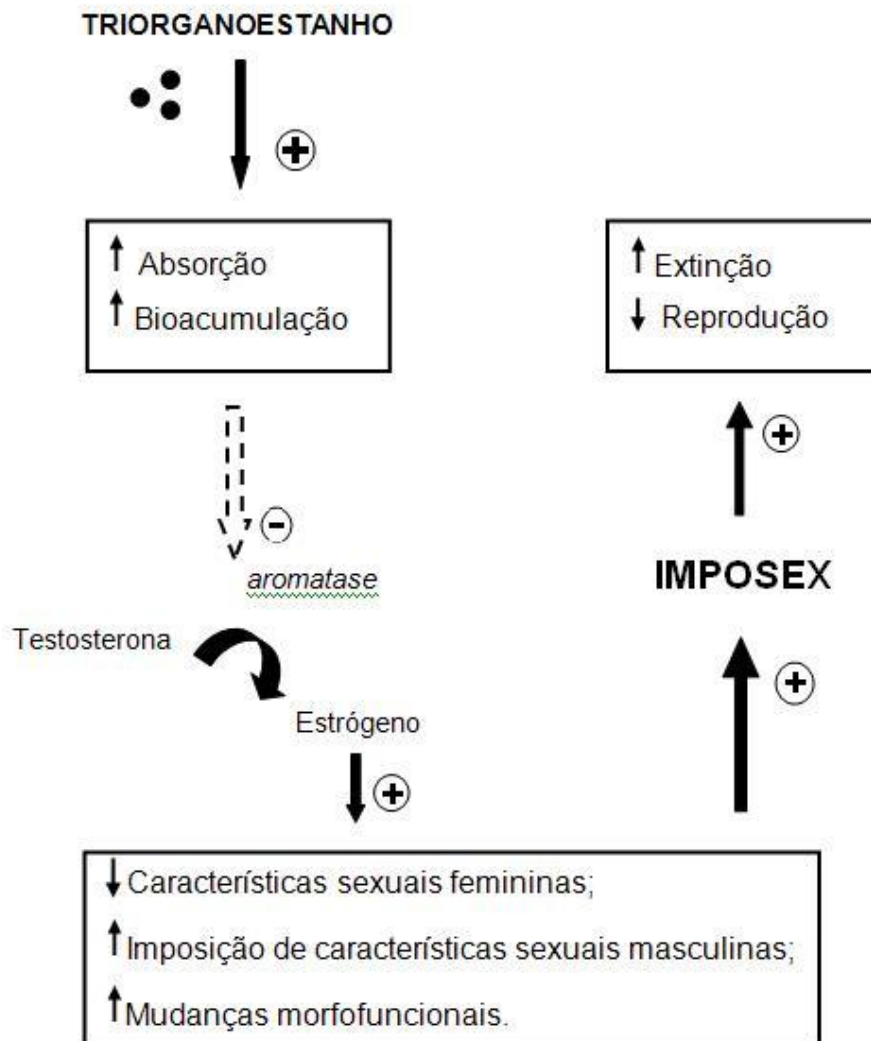


Figura 2 - Diagrama que ilustra o efeito da inibição da enzima aromatase mediada por triorganoestanho, induzindo o imposex. A seta tracejada e as setas contínuas indicam um efeito inibidor (-) e um estimulador (+), respectivamente.

Diante destas descobertas, em dado momento a elevada toxicidade do TBT se sobrepôs à sua importância econômica para a indústria naval e uma série de novas medidas foram propostas quanto à sua utilização. No Brasil, no ano de 1992 em uma conferência realizada no Rio de Janeiro (*United Nations Conference on Environment and Development*), foi sugerida a adoção de uma abordagem de precaução, que inclui avaliação dos impactos ambientais e gerenciamento para o manejo adequado das substâncias perigosas, a fim de impedir a degradação do meio ambiente marinho (Disponível em: Agenda 21. Seção 17.22). Em 2001, um tratado global lançado pela Organização Marítima Internacional (IMO) deixou claro que tintas contendo TBT estariam internacionalmente proibidas e não poderiam ser aplicadas ou reaplicadas em nenhum navio a partir de 2003. Também foi estabelecido que o prazo limite para remoção das tintas com TBT e para o banimento do tráfego das embarcações ainda revestidas com estas tintas seria até setembro de 2008 (ALMEIDA et al., 2007; SONAK et al., 2009).

No entanto, até hoje tal tratado não foi ratificado por todos os países, sendo assim, não há um consenso sobre regulamentações globais equitativas e eficazes para o uso de OTs como biocidas em tintas anti-incrustantes, e os sistemas de vigilância, execução de multas, manutenção ou cassação de registros não foram padronizados. A questão é muito complexa, uma vez que os navios podem ser pintados com tintas anti-incrustantes à base de TBT em países onde não haja regulamentação e, posteriormente, viajam por águas internacionais para países onde o TBT seja de fato proibido, levando os impactos de volta para locais que estavam tentando impedi-los. Erroneamente, um problema global vem sendo cuidado como um acontecimento local (CHAMP, 2000).

Diante das proporções que o uso dos OTs alcançou os prejuízos associados a esses compostos passaram a ser mais evidentes. Além de pertencerem ao grupo dos contaminantes ambientais organometálicos, os triorganoestânicos, como o TBT e o TPT, foram também incluídos na classificação de desreguladores endócrinos, que são compostos exógenos com o potencial de alterar o funcionamento do sistema endócrino como um todo (COLBORN et al., 1993; USEPA, 2000), podendo atuar

diretamente sobre uma glândula endócrina, sobre a expressão de um receptor hormonal e alterar o metabolismo de determinado hormônio em seu órgão-alvo ou ainda influenciar sua ação em outra via hormonal. Estes compostos podem interferir desde a produção e liberação, até a eliminação hormonal do organismo. Podem também mimetizar a ação de hormônios naturais e gerar efeitos ainda não conhecidos nas vias de sinalização (BROWN et al., 2001; OMURA et al., 2001; GROTE et al., 2004; GROTE et al., 2006; TABB; BLUMBERG, 2006; BILA; DEZOTTI, 2007; KISHTA et al., 2007).

Os desreguladores endócrinos podem ser derivados de compostos de origem animal, humana, vegetal ou sintética. No entanto, a sociedade ecotoxicológica internacional está focada nos produtos químicos sintéticos. Preocupação cabível, uma vez que em 2011 a produção de químicos desreguladores já havia ultrapassado 400 milhões de toneladas no mundo (CASALS-CASAS; DESVERGNE, 2011).

Investigações revelaram o elevado potencial tóxico dos desreguladores endócrinos em invertebrados (cracas, gastrópodes) e vertebrados (peixes, roedores e homem) devido à alta biodisponibilidade desses compostos, à sua deposição em sedimentos do ecossistema aquático e bioacumulação nos organismos expostos à contaminação (FERNANDEZ; PINHEIRO 2007). Em roedores, tal exposição induz modificações morfológicas, como perda de peso em órgãos reprodutivos em ambos os gêneros (OMURA et al., 2001; OGATA et al., 2001; GROTE et al., 2004) e esteroidogênese anormal de gametas (SI et al., 2015). Em mamíferos, o TBT, administrado em diferentes concentrações, é responsável por gerar mudanças na função de uma variedade de tecidos endócrinos, tais como pâncreas, pituitária, gônadas e a glândula tireóide (WADA et al., 1982; OBERDÖRSTER et al., 1998; VOS et al., 2000). A exposição ao TBT foi também relacionada aos prejuízos funcionais, tais como o desenvolvimento de fatores de riscos cardiovasculares (SANTOS et al., 2012; RODRIGUES et al., 2014), e disfunções reprodutivas, como ciclicidade estral anormal e modificações na morfofisiologia do ovário (DELGADO FILHO et al., 2011; PODRATZ et al., 2012; GRACELI et al., 2012).

A exposição humana aos desreguladores endócrinos pode ocorrer por meio de diversas fontes, tais como a bioacumulação e transferência ao longo de cadeias alimentares (KANNAN et al., 1995; IWATA et al., 1995; TAKAHASHI et al., 1999; TANABE, 1999; BILA; DEZOTTI, 2007), não somente com a ingestão de peixes e frutos do mar (CHIEN et al., 2002), mas também pelo consumo de carnes, frutas e vegetais contaminados (SOUSA et al., 2017), e por meio da própria água contaminada (LO et al., 2003).

Estudos realizados há quase duas décadas já demonstravam a presença de TBT, DBT e MBT em amostras de sangue e fígado humanos (KANNAN; FALANDYSZ, 1997; KANNAN et al., 1999; TAKAHASHI et al., 1999; Com o passar dos anos foi possível compreender que a acumulação, principalmente do TBT, nos tecidos de diversos organismos traria diversos prejuízos, tais como disfunções neurais, hormonais e metabólicas, tais como o aumento da deposição de lipídeos e obesidade (GRUN et al. 2006; MITRA et al. 2013a; MERLO et al. 2016). Assim, o TBT provoca a adipogênese em camundongos (GRUN et al., 2006), aumenta a deposição de lipídios e ácidos graxos em espécies de pequenos gastrópodes (JANER, 2007), e ainda provoca alterações dose-dependentes na resposta ao estrogênio no rim, epidídimo e tecido adiposo marrom (PENZA, 2011).

Casals-Casas e Desvergne (2011) demonstraram que os prejuízos endócrinos são perceptíveis no desenvolvimento reprodutivo durante a diferenciação sexual, podendo ocorrer em diferentes fases embrionárias e também durante a puberdade, em função de intercorrências na ação dos esteróides sexuais. O TBT é capaz de alterar a ação das enzimas relacionadas com a esteroidogênese ovariana por inibir competitivamente a enzima *aromatase* (uma enzima da via do citocromo P450 envolvida na conversão de testosterona em estradiol), diminuindo a conversão de andrógenos em estrógenos (OMURA et al., 2001; DELGADO FILHO et al., 2011), aumentando os níveis de testosterona e prejudicando o desenvolvimento sexual de ratos (GROTE et al., 2004).

In utero, o TBT ocasionou a redução de peso de roedores recém-nascidos, com aumento da frequência de anormalidades esqueléticas (ADEEKO et al., 2003), diminuição do pesos maternos e dos filhotes, bem como retardo no crescimento e na abertura do olhos na descendência feminina após exposição à dose de 25 µg/Kg de TBTCI (MAKITA et al., 2003). Ainda, em doses mais elevadas, como 10 mg/Kg e 20 mg/Kg, reduziu o número de células germinativas e gonócitos, afetando o desenvolvimento sexual de ratos em ambos os gêneros (KISHTA et al., 2007). Associada a estas perturbações do sistema endócrino, foi relatada a incidência de tumores induzidos por organoestânicos no testículo e na pituitária de ratos (WESTER et al., 1990; DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009). Estudos sobre fertilidade demonstram que alguns fatores como a alteração na nutrição materna, estímulos ambientais diferenciados e estresse, durante o período pré e pós-natal desencadeiam uma maior suscetibilidade e sensibilidade aos diferentes tipos de doenças crônicas (BERTRAM; HANSON, 2001; GLUCKMAN et al., 2008).

A reprodução é um processo fundamental para a manutenção e perpetuação das espécies. Em ambos os sexos, há a necessidade de uma orquestração adequada entre o hipotálamo, hipófise e gônadas para que fertilidade e reprodução não sejam comprometidas. O eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) é o principal modulador da função reprodutiva. As células neurais hipotalâmicas são altamente especializadas e possuem características tanto de neurônios como de células endócrinas, sintetizando e secretando peptídeos neuro-hormonais. Neurônios hipotalâmicos produzem o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), que desempenha um papel central na regulação da cascata de eventos hormonais necessários para a reprodução normal (BAUER-DANTOIN et al. 1995). O GnRH é um hormônio proteico transferido para adeno-hipófise por meio do sistema porta-hipofisário, e estimula tanto a produção quanto a secreção dos hormônios gonadotróficos luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) pelas células gonadotróficas da hipófise (WILDT et al., 1981).

Em ratas, LH e FSH atuam em seus respectivos receptores, desempenhando importante papel por todo o ciclo estral (ou ciclo reprodutivo), que tem duração

média de 4 ou 5 dias (FREEMAN, 1988; SPORNITZ et al., 1999; BIANCHI et al., 2001). Durante o ciclo, o crescimento dos folículos ovarianos, a produção de estrogênio e progesterona, indução da ovulação e formação do corpo lúteo são mediados por LH e FSH (LEGAN; KARSCH 1975; RICHARDS et al., 1980; FILICORI et al., 1986; MAGIAKOU et al., 1997).

No início do crescimento folicular ocorre um aumento nos níveis séricos de FSH. Um ou dois dias depois, os níveis de LH sobem enquanto a secreção ovariana de estradiol se inicia. Entre seguida a secreção de estradiol ovariano é acentuada e FSH diminui. Em paralelo ocorre um aumento na secreção de progesterona e de LH (pico de LH ovulatório), caracterizando os momentos finais da maturação do folículo de Graaf. O pico pré-ovulatório de estradiol e a redução da progesterona promovem a rápida maturação folicular, refletindo no aumento da atividade funcional das células da teca e da granulosa do folículo maduro, que ovula (MAGIAKOU et al., 1997). Já na fase lútea, as células foliculares sofrem hipertrofia (ficam luteinizadas), têm sua capacidade de síntese hormonal aumentada, apresentam aumento de grânulos lipídicos, o volume do núcleo e do retículo endoplasmático liso aumenta, e o folículo pós-ovulatório se torna cada vez mais vascularizado. O LH é necessário para a sobrevivência e manutenção das funções normais do corpo lúteo durante o ciclo reprodutivo. A característica mais importante desse período é o aumento acentuado da secreção de progesterona pelo corpo lúteo. Em paralelo ocorre um aumento no nível de estradiol, porém menor que o da progesterona. O aumento da progesterona ocasiona o declínio de LH e FSH durante a maior parte da fase lútea. Em seguida, o FSH começa a aumentar no final da fase lútea para iniciar o crescimento folicular do ciclo seguinte (YEN, 1978; FILICORI et al., 1986; MAGIAKOU et al., 1997).

Os mecanismos de controle e desenvolvimento do ciclo reprodutivo, desempenhados principalmente por estradiol e progesterona, são normalmente mediados por receptores hormonais específicos. O estrogênio é um hormônio esteróide sintetizado nas células da granulosa ovariana, e suas ações são mediadas por receptores nucleares de estrogênio (ERs): ER α (alfa) e ER β (beta) – codificados

a partir de genes distintos (ESR1 e ESR2) com distribuições e funções variáveis nos tecidos (KATZENELLENBOGEN et al., 1993; KUIPER et al., 1996; COUSE et al., 1997; HANLEY et al., 2000; HALL et al., 2001; GUSTAFSSON, 2003). A expressão de ER α é predominantemente presente no hipotálamo, hipófise e útero (KUIPER et al., 1996), enquanto a expressão de ER β ocorre principalmente no hipotálamo, ovário e pulmão (TREMBLAY et al., 1997). No cérebro feminino, o estrogênio desempenha um papel crítico na regulação da atividade dos neurônios GnRH e gonadotróficos, com efeitos bimodais no hipotálamo, incluindo influências inibitórias e estimuladoras na secreção de GnRH (*feedback* negativo e positivo) (PETERSEN et al., 2003; RADOVICK et al., 2012). As ações da progesterona são mediadas por receptores nucleares de Progesterona-A (PR-A) e Progesterona-B (PR-B) (LEMALE et al., 2008) e estão presentes em vasta distribuição nos órgãos dos indivíduos (KUIPER et al., 1996), desempenhando efeito inibitório do GnRH no hipotálamo (*feedback* negativo).

Embora os neurônios hipotalâmicos do GnRH sejam um dos principais componentes do eixo reprodutivo, ainda não está claro se expressam os receptores de estrogênio (ERs) e progesterona (PRs), que imprimem os efeitos de *feedback* ao neuro-hormônio GnRH (SKINNER et al., 2001). Por isso, muitos estudos têm voltado sua atenção para possíveis mediações interneuronais no eixo HHG. O principal grupo neuronal hipotalâmico deste complexo mediador é o que sintetiza os neuropeptídeos kisspeptina, produtos peptídicos da expressão do gene neuronal *Kiss1* (ROA et al., 2008; NOVAIRA et al., 2012). São conhecidas, até o momento, quatro moléculas de kisspeptinas, formadas a partir de clivagens do precursor comum *prepro-kisspeptina*, também codificado pelo gene *Kiss1* (PINILLA et al., 2012). Após a primeira clivagem do precursor, a kisspeptina-54 (Kp-54) é formada. Essa é a maior das quatro moléculas, contendo 54 aminoácidos (OHTAKI et al., 2001). Mesmo que não exista ainda um consenso em relação à formação das moléculas menores, e que também não se saiba exatamente como se distribuem nos diferentes tecidos, os outros três fragmentos neuropeptídicos que derivam da Kp-54 identificados são: kisspeptina-14 (Kp-14), kisspeptina-13 (Kp-13) e kisspeptina-10 (Kp-10) (KOTANI et al., 2001; OHTAKI et al., 2001; PINILLA et al., 2012).

A ação das kisspeptinas no organismo ocorre em resultado da ativação de seu receptor *Kiss1r*, que é acoplado à proteína G (antes conhecido como GPR54) (SEMINARA et al., 2003; de ROUX et al., 2003; ROA et al., 2008; OAKLEY et al., 2009; SMITH, 2012). Os quatro tipos de kisspeptina podem ativar eficientemente o receptor *Kiss1r*, embora a Kp-10 possua a maior capacidade de ativação (KOTANI et al., 2001). Acredita-se que as kisspeptinas estejam relacionadas na transmissão de sinais centrais e periféricos que controlam a reprodução (TASSIGNY; COLLEDGE, 2010), bem como na secreção pulsátil do GnRH/LH (TENA-SEMPERE, 2010; SMITH, 2012). Dentre os fatos que evidenciam a influência da kisspeptina na liberação e modulação de GnRH estão a presença de terminações dos neurônios *Kiss1* sobre os neurônios GnRH (SMITH et al., 2008), e a produção de receptores *Kiss1r* nos neurônios GnRH (IRWIG et al., 2004, HAN et al., 2005, SMITH et al., 2009). O efeito estimulatório da kisspeptina na secreção de LH, via estímulo do GnRH, foi comprovado após injeção do neuropeptídeo no hipotálamo de ratos (PATTERSON et al., 2006).

O gene *Kiss1* é expresso em vários tecidos do sistema nervoso central. Em mamíferos, ele é expresso nos neurônios *Kiss1* dos núcleos arqueado (ARC) e periventricular anteroventral (AVPV) do hipotálamo (SMITH et al., 2005; MAGEE et al., 2009; HRABOVSKY et al., 2010). Os neurônios *Kiss1* dos núcleos ARC e AVPV expressam os receptores de estrogênio e progesterona, e dessa forma tais hormônios são capazes de inibir a expressão de RNA mensageiro (mRNA) do gene *Kiss1* no hipotálamo de roedores, reduzindo a produção de kisspeptina (SMITH et al., 2005; SMITH et al., 2006). O que reforça a ideia de que ocorra influência de esteróides gonadais na ação da kisspeptina na fisiologia reprodutiva (PINILLA et al., 2012). Logo, a hipótese mais aceita atualmente, é que o aumento de estrogênio no início da formação dos folículos estimularia a expressão do gene *Kiss1* no núcleo AVPV, que em presença de receptores de progesterona ativados, participaria da indução do pico de LH pré-ovulatório durante o anoitecer que antecede a ovulação (ADACHI et al., 2007; SMITH et al., 2011).

No entanto, Navarro e colaboradores (2004) relataram alterações nessa influência em ratas ovariectomizadas, onde o tratamento realizado com estrogênio depois da ovariectomia aparentemente não surtiu efeito na expressão de *Kiss1r* hipotalâmico, sugerindo a participação da kisspeptina no *feedback* positivo do estrogênio no ciclo reprodutivo (SMITH et al., 2009). Além disso, estudos sugerem que o padrão de resposta do FSH à kisspeptina divergem entre fêmeas não ovariectomizadas, quando a resposta é mais rápida e de menor duração, e fêmeas ovariectomizadas que apresentam resposta mais longa (NAVARRO et al., 2005). Portanto, a perfeita associação de kisspeptina e seu receptor formam um complexo regulador excitatório essencial do eixo HHG (THOMPSON et al., 2004), desempenhando assim uma importante função modulatória no início da puberdade (DUNGAN et al., 2006) e na fase adulta (MESSAGER et al., 2005).

Caso a proteína G acoplada ao *Kiss1r* sofra alguma mutação, o receptor passa a não ser corretamente ativado pela kisspeptina, e uma condição de atraso ou ausência de desenvolvimento reprodutivo secundário pode ocorrer em função da deficiência de gonadotrofinas, pela supressão da secreção de GnRH (SEMINARA et al., 2003; de ROUX et al., 2003).

A deficiência nutricional também provoca efeitos negativos no eixo HHG (ESTRADA et al., 2003). Os neurônios *Kiss1* são os principais componentes das vias neuroendócrinas que promovem a relação entre a homeostase energética e a reprodução, assim, a kisspeptina também foi apontada como um possível mediador entre status metabólico e reprodução (SCHNEIDER, 2004, DUNGAN et al., 2006).

Então, a regulação da liberação do GnRH pela ação de kisspeptina é influenciada também por muitos fatores metabólicos, que dentre eles destaca-se o hormônio peptídico leptina, o qual é secretado pelos tecidos adiposos, sinalizando a abundância de energia no organismo (FERNANDEZ-FERNANDEZ et al., 2006). Por isso, estudos vem investigando o papel de mediadores inflamatórios, da obesidade e

da leptina na função do eixo HHG (CHEN et al., 2011; CHAKRABORTY et al., 2016; SOMINSKY et al., 2016) (Figura 3).

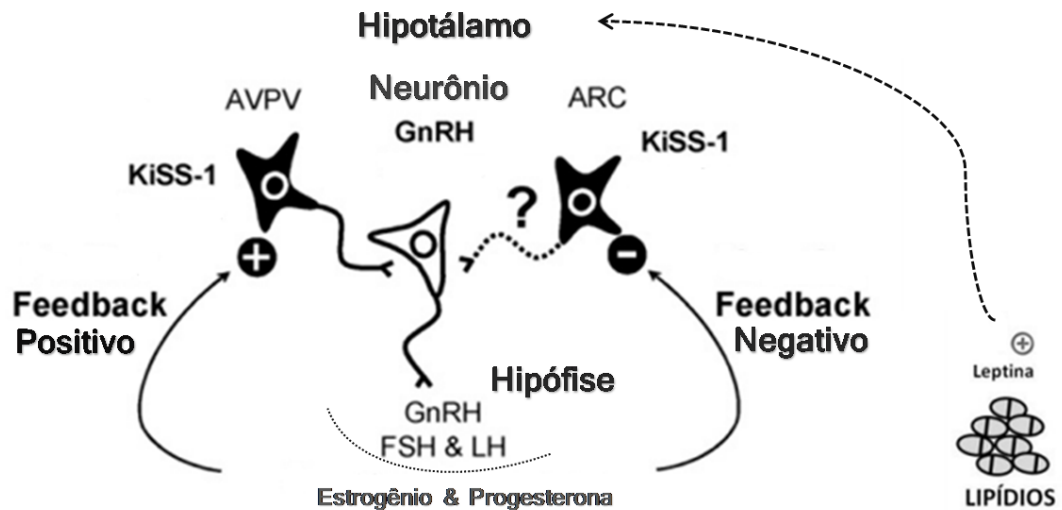


Figura 3 – Esquematização dos mecanismos de *feedback* positivo e negativo exercidos por esteróides ovarianos na regulação de *Kiss1* ao longo do eixo HHG. No detalhe, a influência da leptina no eixo. Fonte: adaptação de SMITH et al., 2009.

Os receptores de leptina (Ob-R) foram localizados nos neurônios *Kiss1* do núcleo ARC, mas não nos neurônios GnRH (QUENNELL et al., 2009, SMITH et al., 2009), então é por meio de interneurônios sensíveis aos efeitos da leptina que sua ação é transmitida para os neurônios GnRH (ROA; TENA-SEMPERE, 2010). A expressão hipotalâmica de *Kiss1* está sob o controle positivo direto da leptina, permitindo a adequada maturação e função dos neurônios GnRH e, conseqüentemente, do eixo HHG (PINILLA et al., 2012). Em resumo, o controle do eixo HHG é resultado de um complexo balanço dinâmico entre sinais excitatórios e inibitórios, e suas funções podem ser afetadas por fatores endógenos e exógenos, como a poluição ambiental e o estado metabólico (PENZA et al., 2011; WALKER et al., 2013; TOPPER et al., 2015; SKINNER et al., 2016).

Em relação aos efeitos nocivos do poluente TBT sobre o sistema reprodutivo e metabólico, pode-se dizer que pouco é esclarecido acerca do possível comprometimento da função do eixo HHG em virtude desta exposição (Figura 4). Então, para testar a hipótese de que o TBT promove anormalidades no eixo HHG, direta (alterações reprodutivas) e/ou indiretamente (disfunções metabólicas), analisamos os principais parâmetros da funcionalidade do eixo em ratas. Ciclicidade estral, níveis de gonadotrofinas, fertilidade, morfologia do aparelho reprodutor, expressão de GnRH e ER, e metabolismo foram avaliados; uma vez que identificar a sinalização do eixo HHG que pode se tornar tóxica quando afetada pelo TBT, contribui substancialmente para a compreensão contínua do eixo HHG, ajudando a identificar possíveis novos alvos de distúrbios metabólicos no eixo HHG por desreguladores endócrinos.

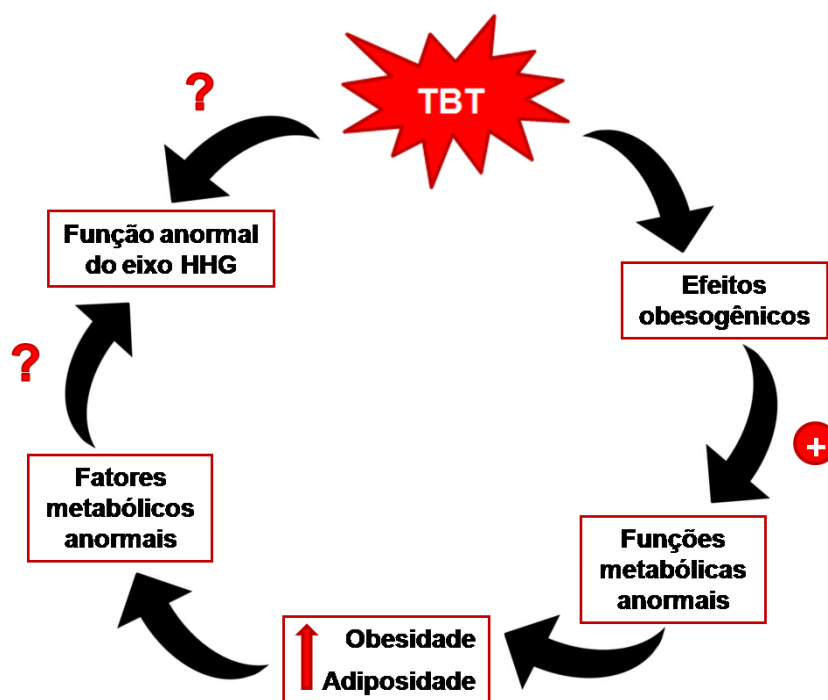


Figura 4 – Hipótese testada no presente trabalho. A exposição ao TBT estaria provocando anormalidades ao longo do eixo HHG diretamente, por alteração dos parâmetros reprodutivos, ou os efeitos obesogênicos do TBT estariam promovendo disfunções metabólicas, capazes de afetar indiretamente o eixo HHG?

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Investigar modificações na função reprodutiva do eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Gonadal associado às complicações metabólicas em função da exposição ao TBT.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os efeitos gerados pela exposição ao TBT:
 - No ciclo estral (regularidade e duração);
 - Nos níveis de gonadotrofinas (basal e pico) e esteróides ovarianos;
 - Na morfofuncionalidade ovariana e uterina, e nas respostas inflamatórias, associadas à obesidade;
 - Na expressão das proteínas dos receptores hormonais gonadais nos tecidos do eixo HHG;
 - Nos mecanismos de *feedback* do estrogênio;
 - Nos parâmetros metabólicos (peso, adiposidade, sensibilidade à insulina e tolerância à glicose).

MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

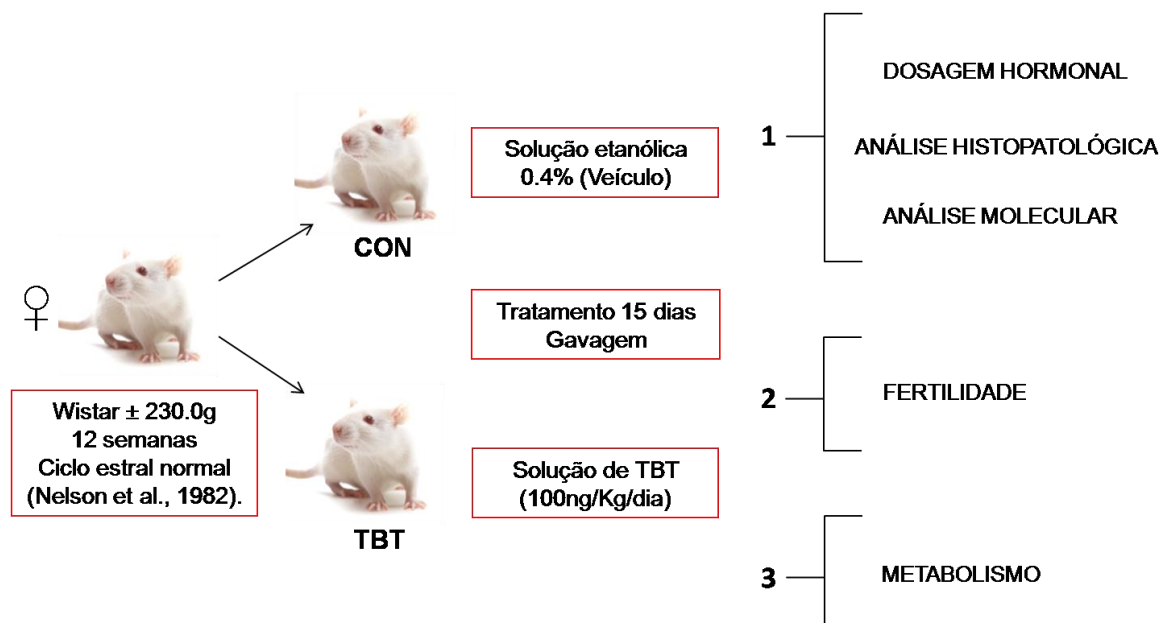


Figura 1 – Desenho experimental do trabalho. Sets de animais experimentais, de acordo com os diferentes experimentos desenvolvidos. Grupos, tipos de tratamento, duração dos tratamentos.

3.2 Químicos

O cloreto de tributilestanho (TBT, 96%, Sigma, St. Louis, Mo., EUA) foi dissolvido em etanol a 0,4% tendo como base nosso estudo anterior (MERLO et al., 2016).

3.3 Animais experimentais

Ratas Wistar adultas (12 semanas de idade) foram mantidas sob temperatura controlada entre 23-25°C com ciclo de claro/escuro de 12:12 horas, e tiveram livre acesso à água e ração durante todo o experimento *ad libitum*. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (106/2011). As ratas foram divididas em dois grupos: Tratou-se diariamente ratas do grupo controle (CON, n = 10) com veículo (etanol a 0,4%) e

ratas do grupo TBT (TBT, n = 10) diariamente com TBT (100 ng/kg/dia) durante 15 dias via gavagem. Os animais foram anestesiados utilizando ketamina e xilazina (90 mg/kg e 4,5 mg/kg, respectivamente, intraperitoneal, *ip*) antes da eutanásia. As doses e a via oral de exposição do TBT foram selecionadas em função de outros trabalhos que demonstraram o aumento dos níveis séricos de estanho e que demonstraram sua toxicidade reprodutiva e metabólica (BERTULOSO et al., 2015; PODRATZ et al., 2015).

3.4 Dosagem de estanho

As concentrações de estanho no soro e no ovário foram quantificadas após serem colhidas as amostras de sangue e de tecido ovariano. Os níveis de estanho foram avaliados utilizando espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, Nexlon 300-D, Perkin Elmer, Alemanha) (PODRATZ et al., 2015). Em resumo, as amostras de sangue e de ovário foram digeridas com peróxido de hidrogênio a 30% (m/m) e ácido nítrico ultrapuro (Elga-Purelab, Marlow, UK) utilizando um forno micro-ondas equipado com vasos de PTFE (microondas Multiwave 3000, Anton Paar, Graz, Áustria); as análises foram realizadas por ICP-MS. Os requisitos da seção de controle de qualidade do método foram cautelosamente seguidos para demonstrar que a quantificação de estanho nas amostras de sangue e ovário foi precisa. O nível de detecção para estanho determinado por ICP-MS foi de 4,0 ng/g e foi determinado para cada análise realizada.

3.5 Avaliação do ciclo estral

Esfregaços vaginais foram obtidos diariamente às 10:00 horas da manhã durante 15 dias em ratas de 3 meses de idade. Foram fixados em lâminas de vidro com metanol, examinados como preparações coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e observados em microscópio de luz para determinar o estágio do ciclo estral via

análise citológica (PODRATZ et al., 2015). Todas as análises foram realizadas por um único observador.

Os estágios do ciclo estral foram classificados como proestro, estro ou metaestro-diestro (M-D) com base nas razões observadas de células cornificadas epiteliais, células epiteliais nucleadas e leucócitos polimorfonucleares, como descrito por Nelson e colaboradores (1982). Proestro é identificado pela presença de aglomerados de células epiteliais nucleadas. O estro corresponde à fase ovulatória onde as células do esfregaço vaginal apresentam-se cornificadas, resultado de intensa descamação do canal vaginal. A predominância de células cornificadas dura 1 dia em um ciclo de 4 dias, ou 2 dias consecutivos em um ciclo de 5 dias. No início do estágio seguinte, metaestro-diestro, as células são diversificadas e sinalizam uma transição, em que há a combinação de células cornificadas epiteliais, células epiteliais nucleadas e leucócitos polimorfonucleares. Na parte final dessa transição, há grande quantidade de leucócitos polimorfonucleares no muco, e não é comum o início de descamação do canal vaginal.

A frequência total, por animal, de cada estágio observado foi utilizada para calcular a duração de proestro, estro, e metaestro-diestro (em dias) e a duração do ciclo estral total (AKAMINE et al., 2010; GUERRA et al., 2010; MARCONDES et al., 2002). Os resultados foram comparados entre os animais dos grupos CON e TBT.

3.6 Ensaios hormonais

Para medir os níveis séricos basais de LH e FSH e os níveis séricos de LH após a estimulação com GnRH ou kisspeptina, recolheram-se amostras de sangue das ratas por meio de decapitação entre 9:00 e 10:00 horas da manhã para evitar os picos de LH dependentes do ciclo que ocorrem à noite do proestro. LH e FSH foram medidos utilizando ensaios ELISA (# 122043 DA LH e #120037 DA-FSH EIA, Diagnostic Systems Laboratories, Saronno, Itália) com um Leitor de Microplacas de Absorbância ELx808 TM (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA); PODRATZ et al., 2015; ROSSI et al., 2016).

Os testes de estimulação com GnRH ou kisspeptina foram realizados em dias diferentes e os níveis séricos de LH foram avaliados. O sangue foi recolhido 10 minutos após injeção de 0,1 nmol/kg de GnRH (subcutânea, sc) (Sigma L7134 LHRH) dissolvido em solução salina; ou 10 min após injeção sc de 10 nmol de kisspeptin-10 (Kiss, EMD Biosciences, Inc) dissolvida em solução salina (UENOYAMA et al., 2015). Amostras foram analisadas em duplicatas. O coeficiente de variação intra-ensaio para cada um foi de 4% a 7%. O coeficiente de variação entre ensaios para cada ensaio foi de 5% a 8%. Os níveis de estrogênio foram medidos utilizando um kit de ELISA para detecção estrogênio (#42K034 DRG Instruments GmbH, Alemanha) (PODRATZ et al., 2015). Os níveis de testosterona também foram medidos utilizando um kit ELISA para testosterona (#29K016 DRG International, Inc., EUA). O limite de detecção da testosterona foi de 1,76 µIU/mL. O coeficiente de variação intra-ensaio para cada ensaio foi de 1,8% a 2,6%. O coeficiente de variação entre ensaios para cada ensaio foi de 2,9% a 6,0%.

3.7 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

O qPCR em tempo real foi realizado para determinar os níveis de expressão do mRNA de GnRH no hipotálamo e do mRNA de Caspase-3 no útero de ratas dos grupos controle e TBT. Os animais foram decapitados, cérebros e úteros foram dissecados e armazenados a -80°C até serem realizadas as análises. O RNA foi isolado destes tecidos utilizando o kit *TRI Reagent RNA Isolation* (Sigma-Aldrich), de acordo com o protocolo fornecido pelo fornecedor. 1µg de RNA foi inversamente transcrito utilizando o kit de construção de cDNA *iScript* (Bio-Rad).

Realizou-se a RT-qPCR em triplicata. Foi utilizada a mix *SYBR Green Master Mix* (Bio-Rad) e uma máquina de qPCR (CFX96, Bio-Rad). Os *primers* utilizados para amplificar o GnRH foram: O *primer* senso 5'-GTGTGTTTGGAAGGCTGCTC-3' e o *primer* anti-senso 5'-CCTCCTTGCCCATCTCTTGG-3'. Os iniciadores utilizados para amplificar a caspase-3 foram: O *primer* senso 5'-GGCCGAATTAATGTATGC-3' e o *primer* anti-senso 5'-GCGCAAAGTGACTGGATG-3'.

Utilizou-se o RNA de β-actina como controle interno. Os *primers* utilizados foram: senso 5'-ACA ACC TTC TTG CAG CTCCTC -3' e anti-senso 5'-GCC GTG TTC AAT

GGG GTA CT -3'. A quantificação relativa da expressão de mRNA foi analisada através do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.8 Avaliação da fertilidade

Fêmeas dos grupos CON e TBT foram mantidas com macho controle (12 semanas de idade e com separação prepucial) em gaiolas de reprodução contínua para avaliar a fertilidade das ratas dos grupos CON e TBT. As avaliações incluíram a frequência das ninhadas e o tamanho das ninhadas. Seis fêmeas CON e seis fêmeas TBT foram mantidas com três machos CON (2 fêmeas e 1 macho/gaiola). As gaiolas foram verificadas diariamente para saber se as ratas haviam tido novas ninhadas e o número de filhotes foi contado. A frequência de ninhadas foi determinada pelo registro de cada nova ninhada produzida durante 90 dias (NOVAIRA et al., 2014).

3.9 Análise morfométrica

Após a remoção de ovários e úteros, o peso úmido dos órgãos foi obtido. Em seguida, órgãos foram fixados em tampão PBS-paraformaldeído (4%), pH 7,4, por um período entre 24 e 48 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em etanol, clarificados em xilol e banhados em parafina a 60°C.

Posteriormente, os blocos de parafina contendo os tecidos foram cortados em um micrótomo (Leica RM 2125 RTS), gerando cortes de 7µm de espessura. Os cortes foram corados com H&E e examinadas por meio de imagens de alta resolução (2048×1536 pixels) em microscópio Olympus (AX70, Olympus, Center Valley, PA). As imagens foram obtidas com uso de câmera AxioCamICc1 e exportadas para o AxioVision Software (software 4.8). Nos cortes de ovário, o número corpo lúteo (CL) foi contado e expresso como número de CL por campo de luz. Nos cortes de útero foram medidas as áreas de endométrio (END) e miométrio (MIO). A morfometria do útero foi avaliada no estágio M-D (PODRATZ et al., 2015).

3.10 Avaliação da deposição de colágeno

Foi feita a avaliação da deposição de colágeno no ovário e no útero dos grupos CON e TBT. Para esta análise, cortes de ovário e útero foram corados com a coloração Picro-sirius *Red*. Foram obtidas 15 fotomicrografias com um aumento de 400x. Os resultados foram expressos com porcentagem de área marcada com a coloração (PODRATZ et al., 2015).

3.11 Apoptose ovariana e ensaios de proliferação

Cortes ovarianos de 4µm de espessura em parafina foram analisados para a marcação de células apoptóticas (TUNEL⁺) em folículos ovarianos. Para essa análise, foi utilizado o kit de detecção de apoptose *in situ* ApopTag® Peroxidase (Chemicon international, Temecula, CA). A reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

A proliferação de células apoptóticas nos ovários foi também avaliada utilizando um anticorpo monoclonal de camundongo contra o antígeno nuclear de proliferação de células (PCNA, Dako) por ensaio imunohistoquímico. O anticorpo PCNA foi visualizado com o kit Dako LSAB® 2 system HRP.

Assim, os índices apoptóticos (porcentagem de células TUNEL⁺ positivas) e proliferativos (porcentagem de células PCNA⁺ positivas) foram determinados pela razão entre o número de células positivas e o número total de células ovarianas.

3.12 Avaliação da atividade de NAG e MPO

A possível atividade de células mononucleares uterinas foi quantificada por medição da enzima lisossômica n-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG), que está presente em níveis elevados em macrófagos ativados (MERLO et al., 2016). Em resumo, o útero foi homogeneizado e centrifugado e o sobrenadante foi incubado com p-nitrofenil-n-acetil-β-D-glicosaminida (Sigma-Aldrich) previamente preparada em tampão

citrato/fosfato, com pH 4,5. A hidrólise do substrato foi mensurada por absorbância de 400nm.

A provável atividade de neutrófilos uterinos foi avaliada por ensaio da atividade da mieloperoxidase (MPO). O útero foi pesado, homogeneizado, centrifugado, e os *pellets* foram ressuspensos em tampão NaPO₄ 0,05 M (pH 5,4), seguido de três ciclos de congelamento-descongelamento por nitrogênio líquido. A atividade de MPO nas amostras foi medida pelas alterações de absorbância (densidade óptica) a 450nm, utilizando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e peróxido de hidrogênio (0,3 mM).

3.13 Western blotting (Immunoblotting)

Os órgãos - hipotálamo, hipófise, ovário e útero - foram homogeneizados em tampão de lise, e a proteína total foi obtida (MERLO et al., 2016). Resumidamente, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de tris-glicina (Bio-Rad). As membranas foram incubadas durante a noite em solução de bloqueio 5%, contendo leite em pó desnatado diluído em tampão tris-salina, com solução de Tween20 a 0.1% e anticorpos específicos.

Os anticorpos primários foram anti-ER α (sc542; 1:500, SCBT, INC), anti-ER β (sc8974, 1:500, SCBT), anti-PR (C-19, sc538, 1:500, SCBT) e anti-GAPDH (sc25778, 1:1000, SCBT). O anticorpo anti-IgG de coelho feito em cabra conjugado com fosfatase alcalina (concentração 1:1000, A3687, Sigma-Aldrich) foi utilizado como anticorpo secundário para todos os *blottings* realizados. O resultado do *western blotting* de cada amostra foi visualizado pela adição de 200 μ L de solução estoque dos reveladores NBT (do inglês, *nitroblue tetrazolium chloride*) e BCIP (do inglês, *5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt, 50 mg/mL*) (sc24981, SCBT). Tais reveladores são utilizados para a detecção colorimétrica da atividade da fosfatase alcalina. As bandas ER α , ER β e PR foram analisadas por meio de unidades densitométricas arbitrárias, utilizando o Programa ImageJ (versão 1.46). Para a relativa expressão de ER α , ER β e PR, seus valores foram divididos pelos valores correspondentes de GAPDH.

3.14 Avaliação do *feedback* negativo por esteróides sexuais

Para avaliar o *feedback* negativo dos esteróides sexuais, fêmeas de 12 semanas de idade foram anestesiadas com ketamina e xilazina, e a ovariectomia (OVX) foi realizada por incisão dorsal. Após um período de recuperação de 14 dias, as ratas OVX foram submetidas à mesma experimentação animal dos grupos CON e TBT previamente descrita. O sangue foi recolhido por decapitação, os soros foram separados por centrifugação e armazenados na temperatura de -80°C até que os níveis de LH e FSH fossem medidos. As amostras de soro de ratas férteis, sem cruzamento, foram obtidas pela manhã no estágio metaestro-diestro. Os níveis hormonais séricos de LH e FSH foram determinados em comparação dos grupos CON, TBT, OVX-CON e OVX-TBT.

3.15 Análise metabólica

Para esta análise, foram acompanhados o ganho de peso corporal das ratas, a glicose em jejum e adiposidade, e peso dos tecidos adiposo branco (TAB) retroperitoneal, parametrial e mesentérico. Os níveis séricos de insulina foram medidos em ratas em jejum por radioimunoensaio, de acordo com as instruções do fabricante (Diagnostic Prod. Corporation, LA, CA) (BERTULOSO et al., 2015). Os níveis séricos de leptina e adiponectina de ratas em jejum foram determinados utilizando kits de ELISA (R&D Systems Europe Ltd., Abington, RU), de acordo com as instruções do fabricante.

3.16 Testes de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina

Para realizar o teste de tolerância à glicose (TTG), as ratas em jejum receberam injeção de D-glicose *ip* (2 mg/g de peso corporal) e os níveis de glicose no sangue foram registrados em 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos utilizando um glicosímetro Accu-Chek (Roche Diagnostics Corp, Ind) (BERTULOSO et al., 2015).

Foi também realizado um teste de sensibilidade à insulina (TSI) em ratas dos grupos CON e TBT sem jejum. As ratas receberam injeção de insulina *ip* (0,75 U/kg de peso corporal, Sigma-Aldrich). Os níveis de glicose no sangue foram registrados em 0, 15, 30 e 60 minutos após a injeção de insulina ou até ao momento em que os níveis de glicose eram semelhantes entre os grupos analisados.

3.17 Análise estatística

Todos os dados são reportados como média \pm EPM (erro padrão da média). O teste de normalidade utilizado para avaliar os dados foi o D'Agostino e Pearson omnibus. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando os testes estatísticos t-Student, ANOVA uma via e ANOVA duas vias para dados gaussianos (seguidos de teste de Tukey).

Além disso, para os dados não gaussianos, utilizou-se o teste Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis (seguidos por teste Dunn). O valor $*p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

4.1 Acumulação de estanho

No grupo TBT, os níveis de estanho (Sn) no sangue em comparação com os ratos do controle foram maiores (CON: $3,97 \pm 0,58$; TBT: $48,70 \pm 9,72 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n=5$, $p \leq 0,01$, Figura 1A). De forma semelhante, os níveis de estanho no tecido ovariano são maiores nas ratas do grupo TBT em comparação com o controle (CON: $180,26 \pm 4,98$; TBT: $578,64 \pm 99,48 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n=5$, $p \leq 0,01$, Figura 1B).

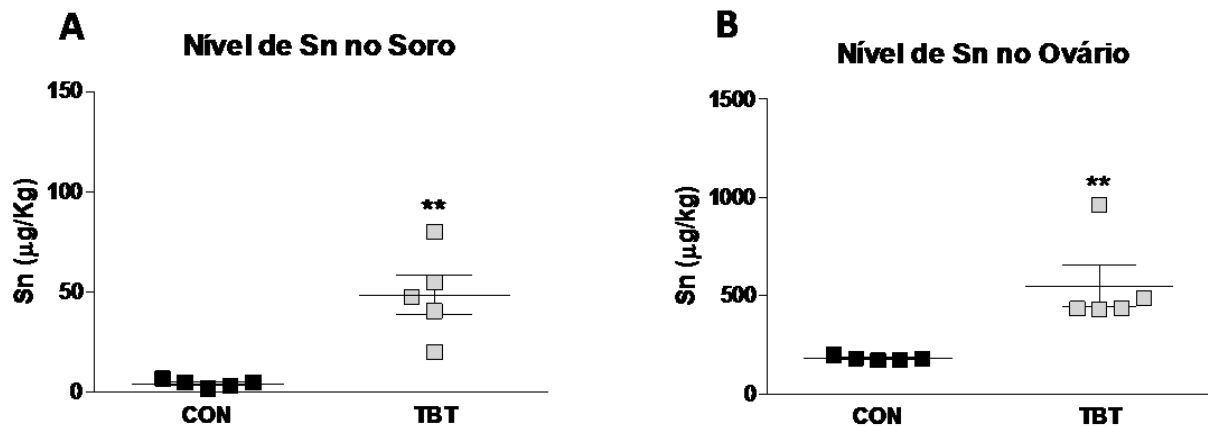


Figura 1 – Dosagem de estanho (Sn) no soro e no ovário de ratas CON e TBT. **(A)** Ratas do grupo TBT apresentaram maiores níveis séricos de Sn. **(B)** Ratas do grupo TBT apresentaram níveis mais elevados de estanho no tecido ovariano. (teste t-Student). Valores expressos como média \pm EPM. ** $p \leq 0.01$.

4.2 Ciclos estrais anormais

As ratas do grupo TBT exibiram ciclos estrais irregulares. A duração dos estágios do ciclo foi anormal em comparação ao grupo controle (Figura 2A). No grupo TBT as ratas tiveram menos dias em proestro (CON: $0,95 \pm 0,04$; TBT: $0,50 \pm 0,05$ dias, $n=8-10$, $p \leq 0,05$, Figura 2B) e permaneceram predominantemente em estágio de M-D

persistente em comparação com os animais controle (CON: $1,74 \pm 0,19$; TBT: $3,10 \pm 0,40$ dias, $p \leq 0,05$). As ratas do controle apresentaram um comprimento de ciclo médio de $3,60 \pm 0,21$ dias. Em contraste, as ratas do TBT exibiram um ciclo estral anormal, que variou entre 3 e 5,5 dias ($p \leq 0,05$, Figura 2B). Em TBT, as ratas permaneceram no estágio M-D em 70% do tempo, o que indica um padrão significativamente diferente no ciclo dos ratos expostos ao TBT.

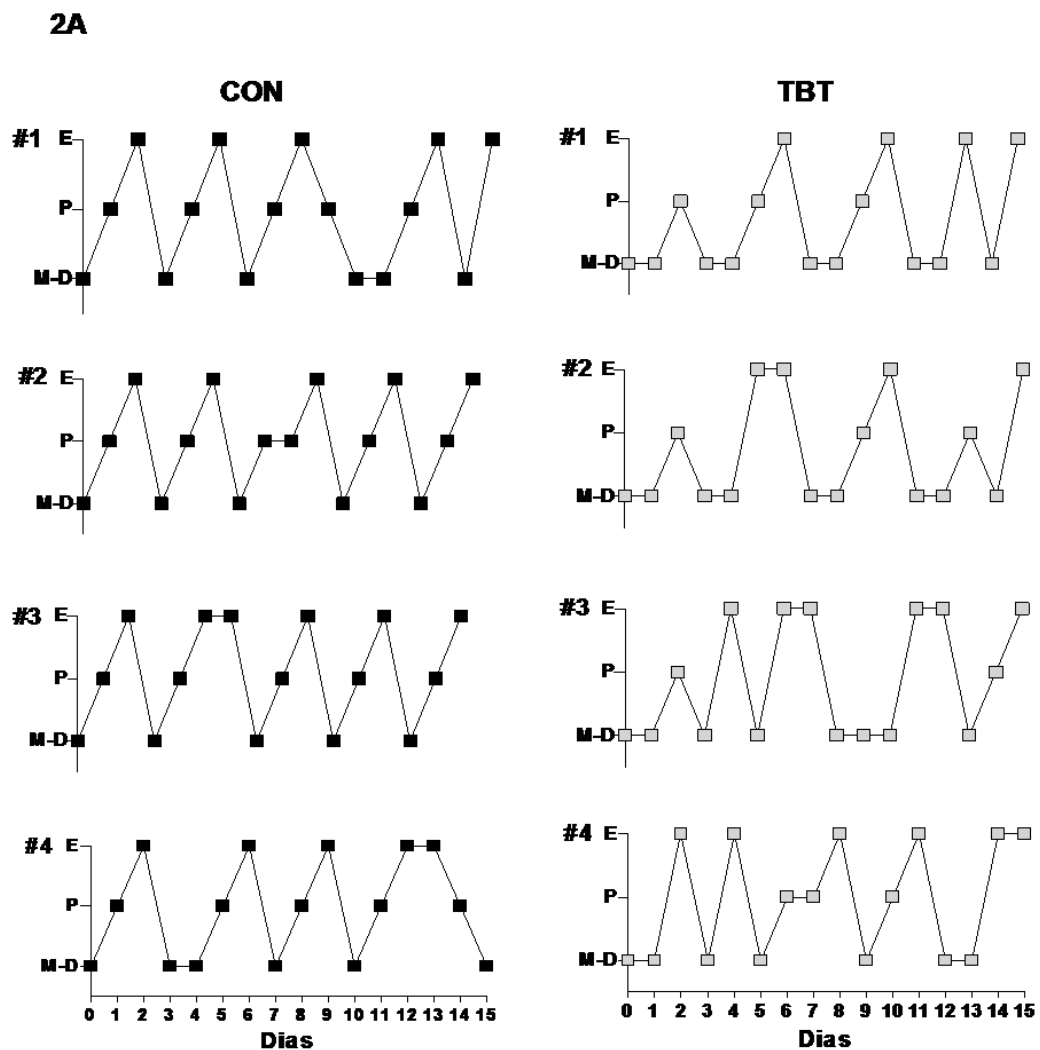


Figura 2A – As ratas TBT têm ciclo estral anormal. (A) Representação gráfica dos ciclos estrais de ratas CON e TBT determinados por citologia vaginal durante 15 dias.

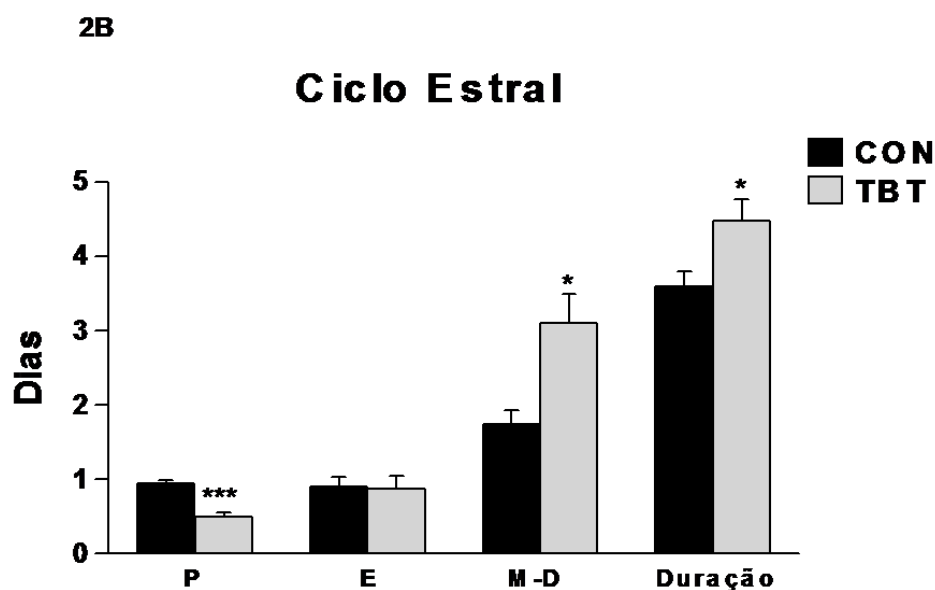


Figura 2B – Representação gráfica do número de dias em cada estágio do ciclo e da duração (comprimento) total do ciclo. Proestro (P), estro (E), Metaestro-Diestro (M-D). ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$

4.3 Baixos níveis de LH basal e de pico

Os valores basais de LH em ratas expostas ao TBT foram menores (CON: $2,39 \pm 0,06$ mU/mL; TBT: $1,51 \pm 0,21$ mU/mL, $n=5-6$, $p \leq 0,01$, Figura 2C). Os valores do pico de LH também foram menores em TBT (CON: $19,84 \pm 0,08$ mU/mL; TBT: $16,02 \pm 0,09$ mU/mL, $n=5-6$, $p \leq 0,01$, Figura 2C). Não houve diferença significativa nos níveis séricos basais e de pico de FSH nos grupos CON e TBT (dados não apresentados).

4.4 Reduzida expressão de mRNA do GnRH hipotalâmico

A expressão de mRNA do GnRH foi aproximadamente 45% mais baixa no tecido hipotalâmico das ratas do grupo TBT ($n=4$, $p \leq 0,05$) (Figura 2D).

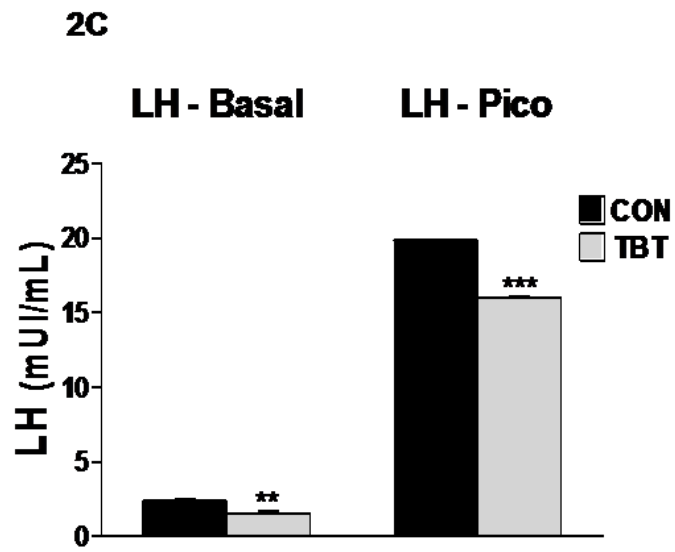


Figura 2C – Níveis séricos de LH basal e durante o pico hormonal. ** $p \leq 0.01$ e *** $p \leq 0.001$.

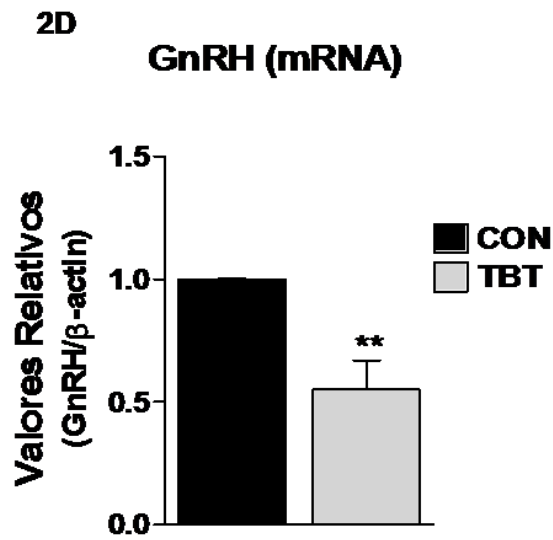


Figura 2D – Análise RT-qPCR para determinar expressão de mRNA do GnRH hipotalâmico.

** $p \leq 0.01$.

4.5 Menor responsividade de GnRH

Os valores séricos de LH em CON e TBT foram elevados após injeção de GnRH em comparação com os níveis basais dos mesmos grupos (CON: $2,39 \pm 0,06$ mU/mL; CON após injeção de GnRH: $5,60 \pm 0,09$ mU/mL; TBT: $1,51 \pm 0,21$ mU/mL; TBT após injeção de GnRH: $4,17 \pm 0,28$ mU/mL, $n=5-6$, $p \leq 0,001$, Figura 2E).

É interessante apontar que foi identificada uma redução na responsividade ao GnRH de aproximadamente 24% nos animais do grupo TBT quando houveram alterações nos níveis séricos de LH em resposta ao GnRH ($p \leq 0,001$, Figura 2E). Este dado sugere um comprometimento da função gonadotrófica devido à exposição ao TBT.

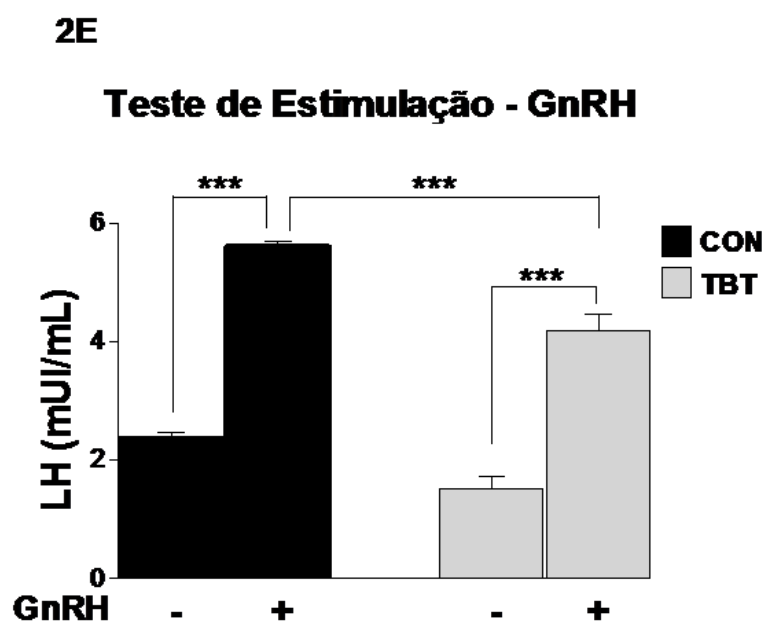


Figura 2E – Teste de estimulação com GnRH. Avaliação dos níveis séricos de LH após 10 min da injeção de GnRH ($0,1\text{nmol/kg ip}$). As ratas dos grupos CON e TBT tratadas com GnRH são indicadas como **GnRH +**. Ratas tratadas com injeção de solução salina são indicadas como **GnRH -**. ANOVA de duas vias indicou uma interação entre os grupos e o tratamento (seguida de teste de múltiplas comparações de Tukey). *** $p \leq 0,01$.

4.6 Baixa resposta à kisspeptina

Após estimulação exógena (injeção) de kisspeptina, os valores de LH nos grupos CON e TBT aumentaram em comparação com os níveis basais de LH dos mesmos grupos (CON: $2,39 \pm 0,06$ mU/mL; CON após injeção de kisspeptina: $6,80 \pm 0,11$ mU/mL; TBT: $1,51 \pm 0,21$ mU/mL; TBT após injeção de kisspeptina: $4,43 \pm 0,16$ mU/mL, $n=5-6$, $p \leq 0,001$, Figura 2F).

Curiosamente, foi identificada uma redução da sensibilidade à kisspeptina de aproximadamente 25% no grupo TBT, quando os níveis de LH sofreram alterações ($p \leq 0,001$, Figura 2F). Este dado sugere um comprometimento do GnRH neuronal nos indivíduos que sofrem a ação do TBT.

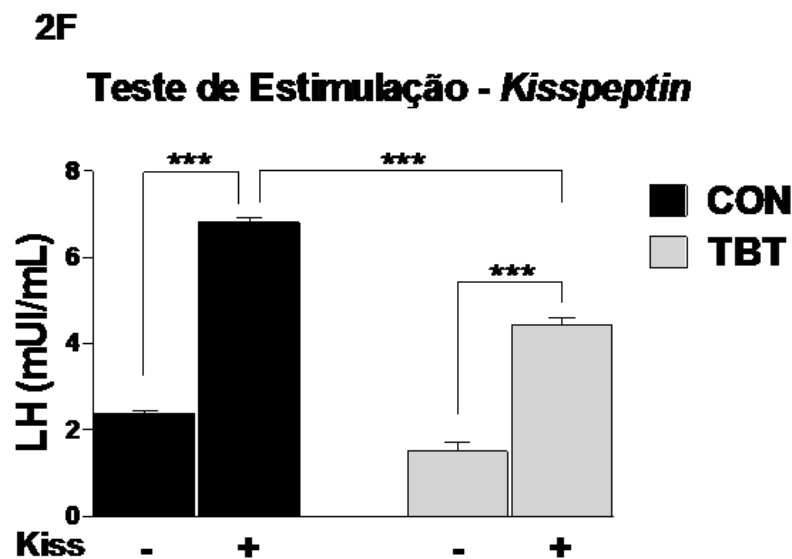


Figura 2F – Teste de estimulação com kisspeptina. Avaliação dos níveis séricos de LH após 10 min da injeção de kisspeptina-10 (10nmol *ip*). As ratas dos grupos CON e TBT tratadas com kisspeptina-10 são indicadas como **Kiss +**. Ratas tratadas com injeção de solução salina são indicadas como **Kiss -**. ANOVA de duas vias indicou uma interação entre os grupos e o tratamento (seguida de teste de múltiplas comparações de Tukey). *** $p \leq 0,001$.

4.7 Deficiências na fertilidade

As evidências de gravidez, o número, a freqüência das ninhadas (quadrados nas linhas da figura 3), e o tamanho das ninhadas (números acima dos quadrados) foram verificados. A freqüência da ninhada de cada grupo foi determinada registrando o número de ninhadas produzidas durante um período de observação de 90 dias. A freqüência das ninhadas em TBT foi menor (CON: $3,33 \pm 0,21$ ninhadas; TBT: $2,16 \pm 0,16$ ninhadas, $p \leq 0,05$, $n=6$, Figura 3.1B). As ratas do CON produziram uma média de $8,88 \pm 0,37$ filhotes por ninhada ($n=20$ ninhadas), enquanto que as ratas de TBT tiveram uma média mais baixa, de $7,69 \pm 0,29$ filhotes por ninhada ($n=13$ ninhadas, $p \leq 0,05$, Figura 3.1C).

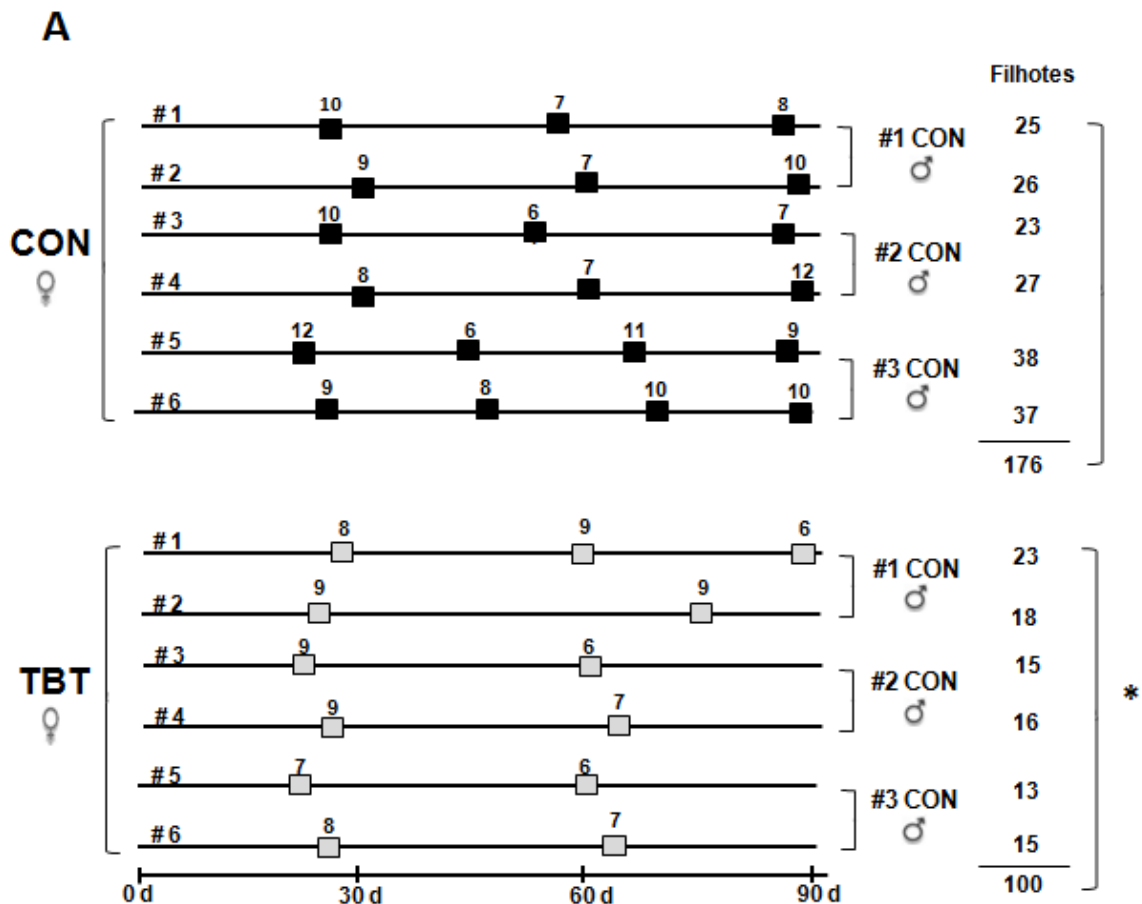


Figura 3 – A fertilidade foi prejudicada em TBT. (A): Representação esquemática da avaliação reprodutiva em ratas dos grupos CON e TBT. Os quadrados indicam ninhadas, e o número acima de cada quadrado representa o número de filhotes da respectiva ninhada. * $p \leq 0,05$.

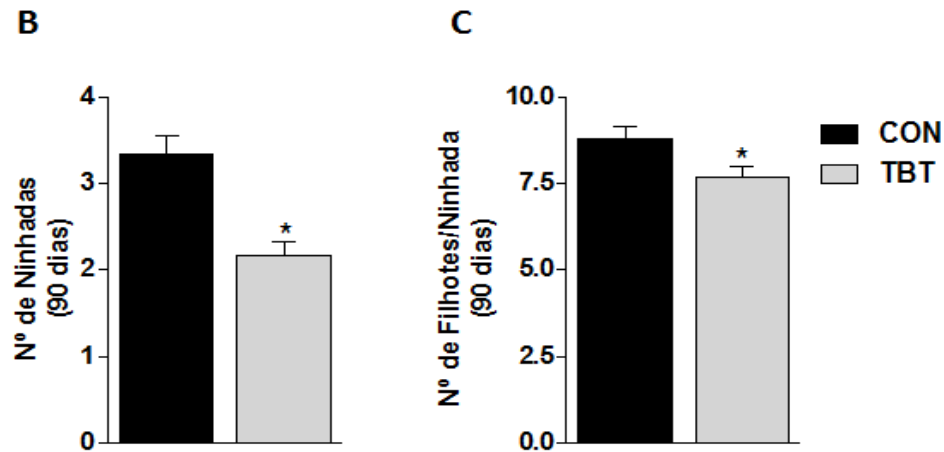


Figura 3.1 – (B): Representação gráfica do número de ninhadas ao longo de 90 dias. (C): Representação gráfica da razão número de filhotes por ninhada. (teste t-Student). * $p \leq 0,05$.

4.8 Alterações ovarianas e hormonais

A anatomia do ovário foi avaliada durante o estágio M-D (Figura 4). Foi identificada atrofia dos ovários e redução de aproximadamente 36% do peso ovariano no grupo TBT (CON: $94,83 \pm 6,69$; TBT: $60,00 \pm 13,65$ mg, $n=5$, $p \leq 0,05$, Figura 4A). Os valores de testosterona no grupo TBT foram maiores (CON: $0,20 \pm 0,01$ ng/mL; TBT: $0,35 \pm 0,03$ ng/mL, $n=5-6$, $p \leq 0,05$, Figura 4B), já os níveis de estrogênio sérico diminuíram neste grupo (CON: $16,47 \pm 0,57$ pg/mL; TBT: $12,34 \pm 0,49$ pg/mL, $n=5-6$, $p \leq 0,05$, Figura 4C).

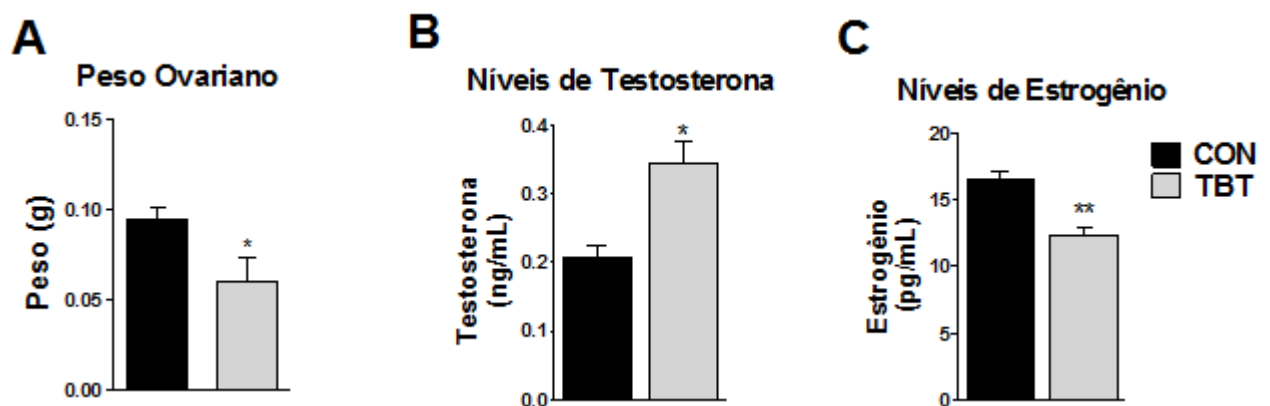


Figura 4 – Representações gráficas (A): do peso ovariano. (B): dos níveis séricos de testosterona. (C): dos níveis séricos de estrogênio. (teste t-Student). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$.

4.9 Corpos lúteos e fibrose ovariana

Os cortes histológicos ovarianos indicam folículos com desenvolvimento regular e presença de múltiplos corpos lúteos (CL) nos ovários de ratas do controle (Figura 4.1D). No entanto, no geral, os ovários das ratas de TBT apresentaram menor organização, presença de folículos císticos (Cis), células apoptóticas nos folículos antrais e ruptura na oogênese (Figura 4.1E). Além disso, em TBT os ovários apresentaram redução no número de CL (CON: $5,62 \pm 0,42$; TBT: $3,82 \pm 0,65$ CL/campo de luz, $p \leq 0,05$, $n=5$, Figura 4.1F). Nas figuras 4.1G e 4.1H é possível notar que a deposição de colágeno do ovário foi maior em TBT. O gráfico da figura 4.1I mostra os valores da análise (CON: $213,40 \pm 8,00$; TBT: $290,11 \pm 13,94 \times 10^3\%$, $n=5$, $p \leq 0,001$).

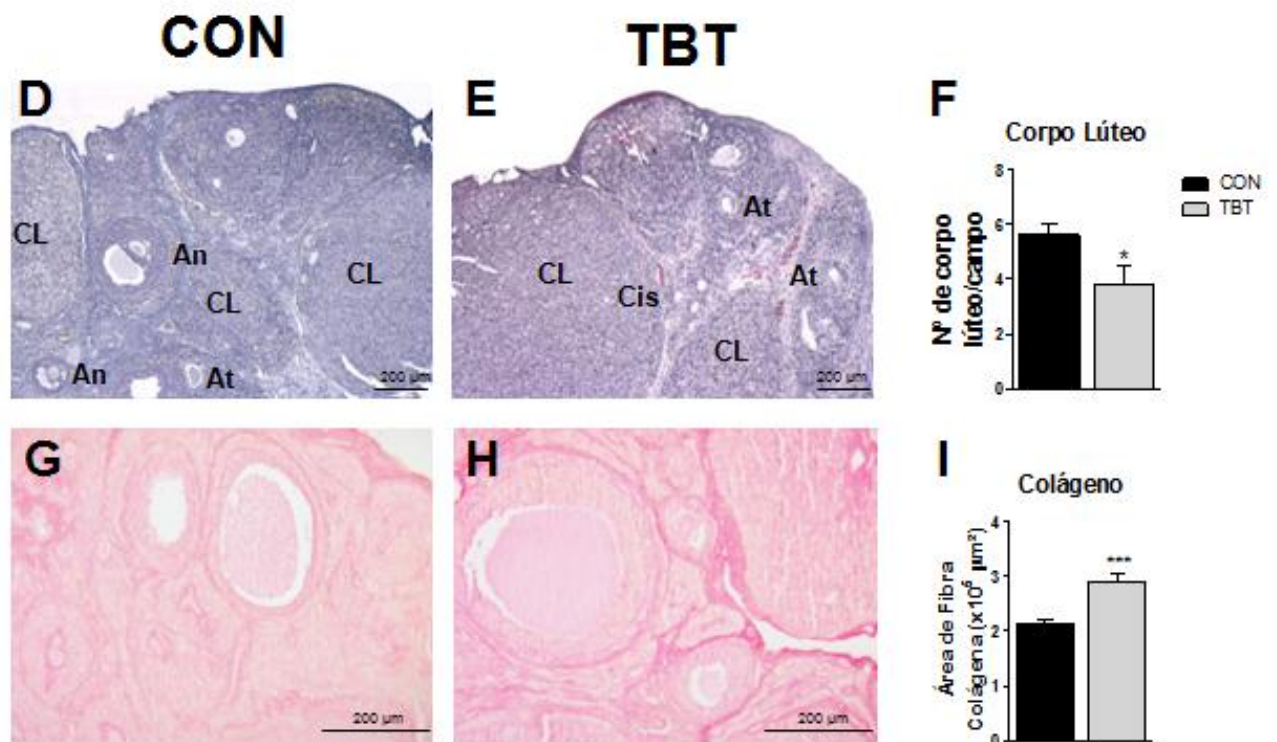


Figura 4.1 – Cortes ovarianos corados com H&E. (D) e (E). **Cis**: indica folículos císticos, **At**: folículos atrésicos e **An**: folículos antrais. (F): Representação gráfica do número de corpos lúteos (**CL**) ($n = 5$). (G) e (H): Cortes ovarianos corados com Picro-sirius Red. (I): Representação gráfica do índice de deposição de fibras colágenas. Bar=200μm (D, E, G e H). (teste t-Student). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$.

4.10 Apoptose e células PCNA positivas

O número de células apoptóticas (TUNEL⁺) (seta, Figura 4.2K) foi maior no grupo TBT (CON: 0.15 ± 0.04 ; TBT: 1.27 ± 0.11 %, $n=4$, $p \leq 0.001$, Figura 4.2L). Os índices de células PCNA⁺ foram maiores na camada granulosa (G) e da teca (T) nos ovários do grupo TBT (CON-G: 54.86 ± 2.52 ; TBT-G: 77.94 ± 1.66 ; CON-T: 30.24 ± 2.29 ; TBT-T: 36.26 ± 2.15 %, $n=4$, $p \leq 0.01$, Figura 4.2P).

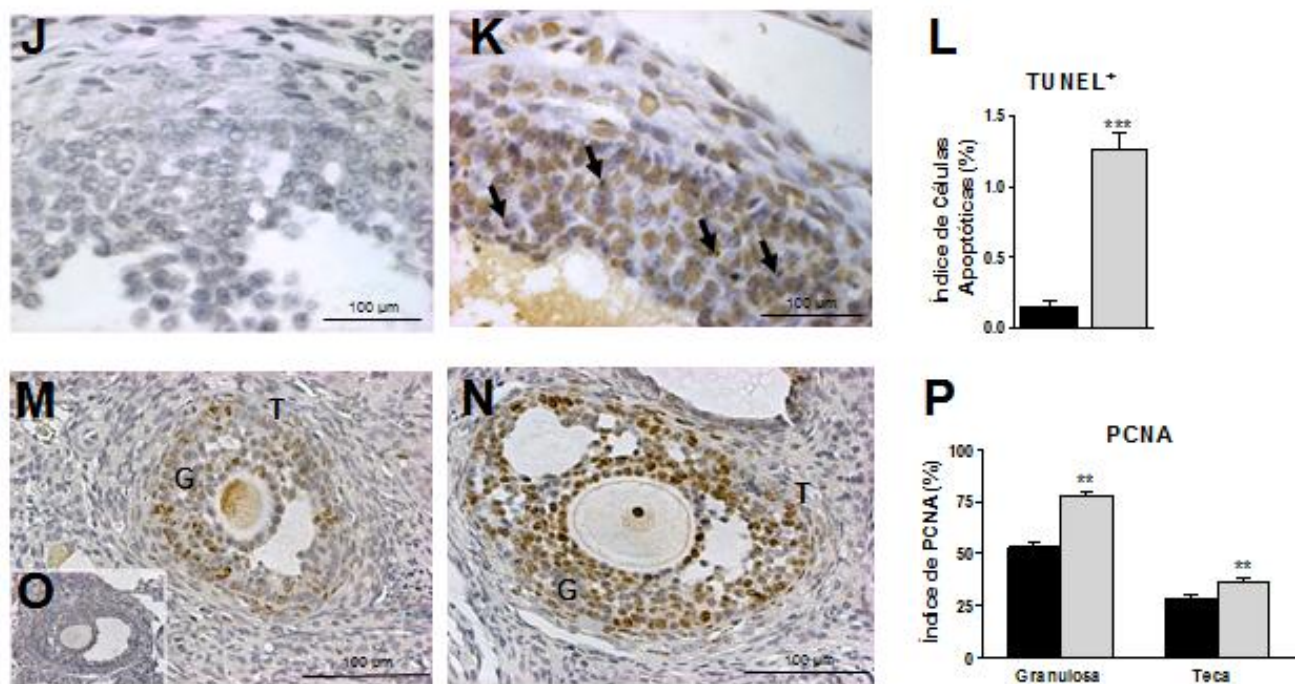


Figura 4.2 – Cortes ovarianos. (J) e (K). **Setas** representam células TUNEL⁺. (L): Representação gráfica do índice de células apoptóticas (TUNEL⁺). (M) e (N): Cortes ovarianos com coloração em células PCNA⁺ (O): Detalhe mostra o controle negativo, ou seja, sem coloração PCNA⁺ (P): Índice de células PCNA⁺ nas camadas da granulosa (G) e teca (T) ovarianas. Bar=100μm (J, K, M e O). (teste t-Student). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$.

4.11 Atrofia, inflamação e fibrose uterina

Foi identificada atrofia nos úteros e redução de aproximadamente 25% no peso uterino em TBT (CON: $0,49 \pm 0,05$; TBT: $0,36 \pm 0,02$ g, $n = 5$, $p \leq 0,05$, Figura 5A). Os cortes corados com H&E mostram aspectos regulares no endométrio luminal (EL), no epitélio glandular (EG) e no miométrio (MIO) das ratas CON (Figuras 5.1B, B1, B2 e B3). No entanto, os úteros do grupo TBT apresentam células apoptóticas nas regiões EL e EG (cabeça da seta), menor organização no MIO (C2, estrela), além da presença de células inflamatórias (setas vermelha e preta) (Figuras 5.1C, C1, C2 E C3). A área do endométrio (END) em TBT é reduzida (CON: 1.50 ± 0.17 ; TBT: $0.96 \pm 0.14 \times 10^9 \mu\text{m}^2$, $n = 4$, $p \leq 0.05$, Figura 5.1D).

Não houve diferença significativa na área de MIO entre os grupos CON e TBT ($n = 4$, $p \geq 0,05$, Figura 5.1D). Um aumento na atividade da MPO uterina foi identificado em TBT (CON: $0,41 \pm 0,07$; TBT: $0,70 \pm 0,08$ OD/ μg , $n = 5$, $p \geq 0,01$, Figura 5.1E). A atividade de NAG também foi maior em TBT (CON: $0,31 \pm 0,02$; TBT: $0,65 \pm 0,06$, nmol/ μg , $n = 5$, $p \leq 0,05$, Figura 5.1F). O mRNA de Caspase-3 apresentou expressão 50% maior nos úteros do grupo TBT ($n=4$, $p \leq 0,05$, Figura 5.1G), e a deposição de colágeno no útero foi maior em TBT (CON: 213.40 ± 8.00 ; TBT: $290.11 \pm 13.94 \times 10^3\%$, $n = 5$, $p \leq 0.001$, Figura 5.1J).

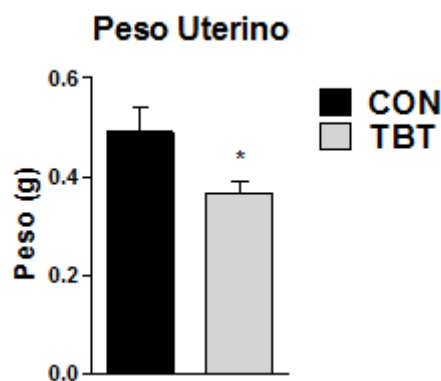


Figura 5 – Anatomia, morfologia e inflamação do útero em ratas. (A) O útero TBT exibiu atrofia e redução do peso do útero. * $p \leq 0,05$.

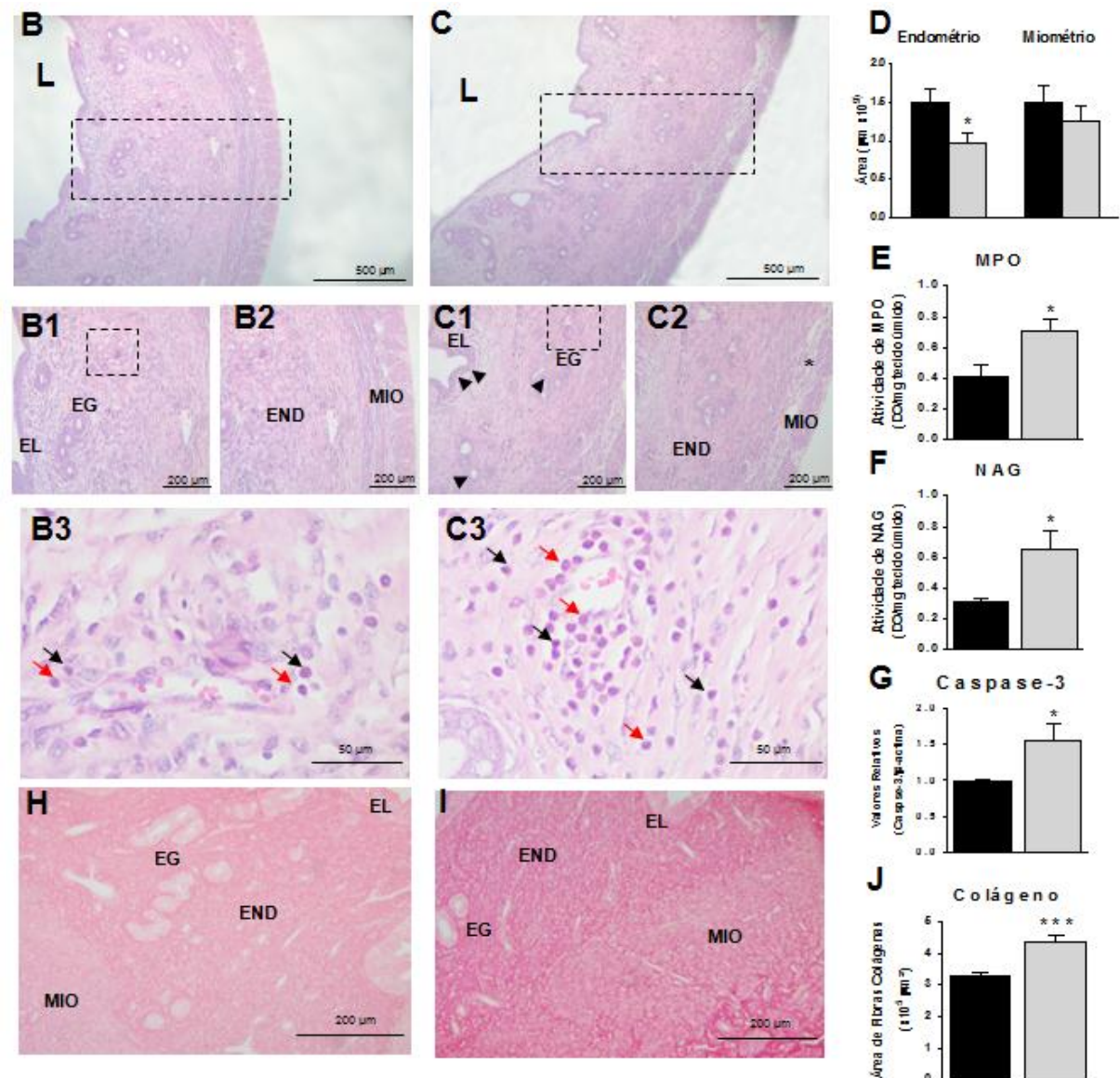


Figura 5.1 – Cortes histológicos de úteros. Grupo CON (B, B1, B2 e B3) e do grupo TBT (C, C1, C2 e C3) foram coradas com H&E. Presença de células apoptóticas no EL e EG (cabeça de seta), MIO menos organizado (asterisco), presença de células inflamatórias (C3, PMN: seta vermelha e MN: seta preta) em úteros de TBT. (D): Representação gráfica da avaliação da área do endométrio (END) uterino. (E) e (F): Gráfico que mostra o aumento da atividade de MPO e NAG em TBT. (G): Resultado da análise de RT-qPCR de mRNA de capase-3. (H) e (I): Cortes histológicos uterinos corados com Picro-sirius Red evidenciando fibras colágenas. (J): Representação gráfica da maior deposição de colágeno no grupo TBT. (teste t-Student). Bar=500 μm (B e C). Bar=200 μm (B, B1, B2, C, C1, C2, H, I). Bar=50 μm (B3, C3). **L**: lúmen. **EL**: epitélio luminal. **EG**: epitélio glandular. **MIO**: miométrio. **PMN**: células polimorfonucleares. **MN**: células mononucleares. **NAG**: N n-acetil- β -D-glicosaminidase. **MPO**: Mieloperoxidase. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$.

4.12 Regulação anormal de ER α e ER β

Nenhuma diferença foi identificada na expressão de ER α no hipotálamo de CON e TBT ($p \geq 0,05$, Figura 6A). Entretanto, a expressão de ER α mostrou-se menor na hipófise, no ovário e no útero das ratas de TBT (CON-hipófise: $1,00 \pm 0,06$; TBT-hipófise: $0,73 \pm 0,05$; CON-ovário $1,02 \pm 0,04$; TBT-ovário: $0,71 \pm 0,08$; CON-útero: $1,00 \pm 0,03$; TBT-útero: $0,91 \pm 0,07$, $n=4$, $p \leq 0,05$, Figuras 6C, E e G).

Nenhuma diferença foi identificada na expressão do ER β no hipotálamo de CON e TBT ($p \geq 0,05$, Figura 6B). Foi identificada a redução na expressão de ER β na hipófise em TBT (CON: $1,00 \pm 0,02$, TBT: $0,80 \pm 0,07$; $n = 4$, $p \geq 0,05$, Figura 6D). Nenhuma diferença foi identificada na expressão de ER β no ovário de CON e TBT ($p \geq 0,05$, Figura 6F). Entretanto, a expressão de ER β foi maior nos úteros de TBT (CON: $1,00 \pm 0,03$; TBT: $1,28 \pm 0,09$; $n = 4$, $p \geq 0,05$, Figura 6H). Além disso, não foi identificada diferença na expressão de PRs entre o eixo HHG e útero em CON e TBT (dados não apresentados).

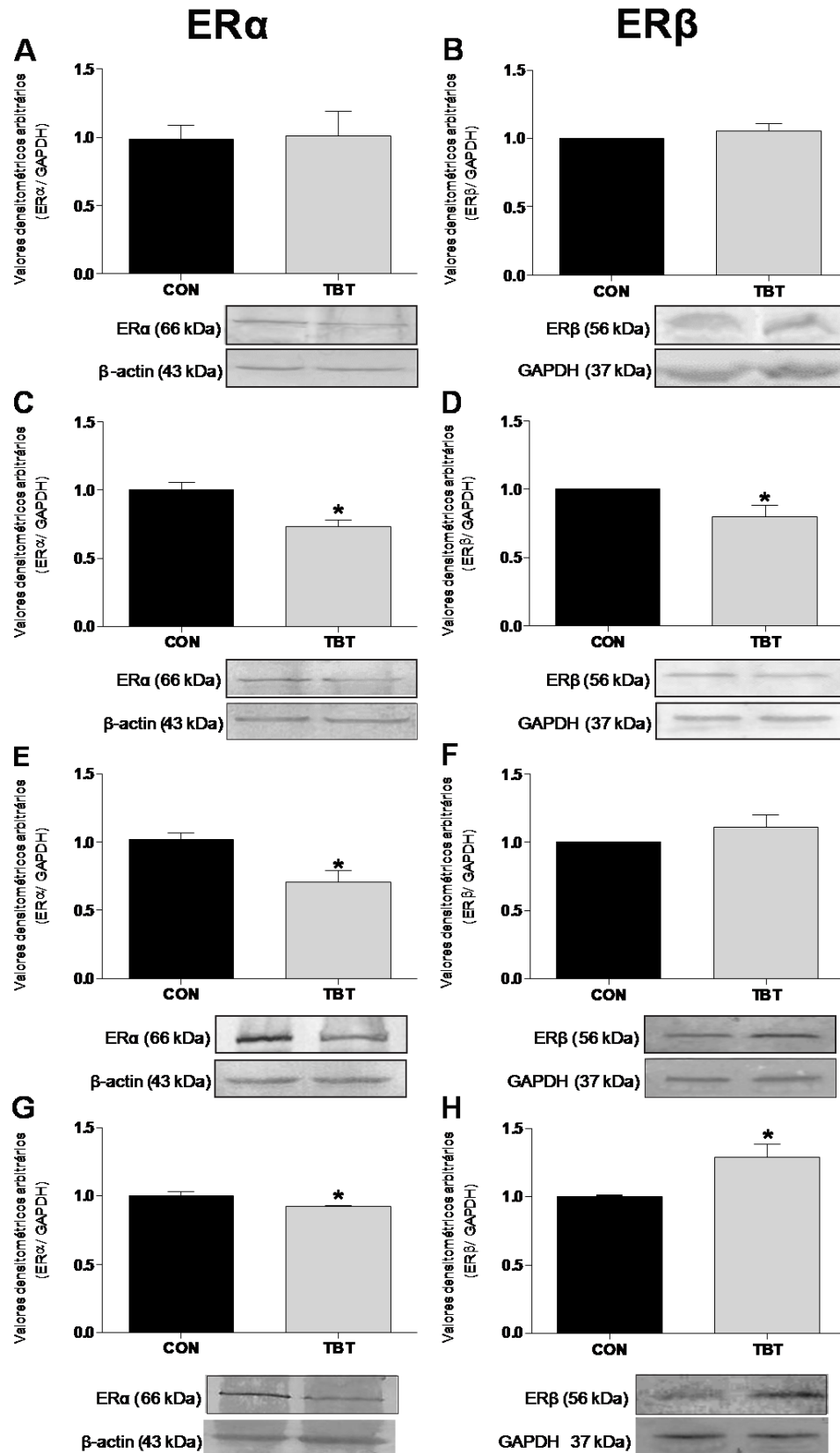


Figura 6 – Resultados da avaliação da expressão das proteínas dos receptores ERα e ERβ: (A) e (B): no hipotálamo, (C) e (D): na hipófise, (E) e (F): no ovário e (G) e (H): no útero dos grupos CON e TBT. (teste t de Student) * $p \leq 0,05$.

4.13 *Feedback* negativo do estrogênio anormal

Os níveis de LH em OVX-CON aumentaram em comparação com CON em M-D (OVX-CON: $5,03 \pm 0,24$ mU/mL; CON: $2,40 \pm 0,07$ ng/mL, $n=5$, $p \geq 0,001$, Figura 7A). Os níveis séricos de LH em OVX-TBT foram maiores do que TBT (OVX-TBT: $4,13 \pm 0,17$ mU/mL; TBT: $1,51 \pm 0,22$ ng/mL, $n=5$, $p \leq 0,001$, Figura 7A). O aumento nos níveis de LH foram aproximadamente 18% menores no grupo OVX-TBT em relação ao OVX-CON ($p \geq 0,05$, Figura 7A).

Além disso, os valores de FSH em OVX-CON foram maiores que em CON (OVX-CON: $7,74 \pm 0,49$ mU/mL; CON: $3,11 \pm 0,24$ mU/mL, $n=5$, $p \leq 0,01$, Figura 7B). Os níveis de FSH em OVX-TBT foram mais altos que em TBT (OVX-TBT: $4,61 \pm 0,47$ mU/mL; TBT: $2,92 \pm 0,45$ ng mL, $n=5$, $p \leq 0,05$, Figura 7A).

Houve um aumento de aproximadamente 40% nos níveis de FSH em OVX-TBT em comparação com OVX-CON ($p \leq 0,05$, Figura 7A). A expressão de mRNA do GnRH hipotalâmico nos ratos de OVX-CON foi significativamente mais alta em comparação com a expressão de mRNA do GnRH em CON ($p \leq 0,05$, $n=4$, Figura 7C). De forma semelhante, as ratas em OVX-TBT exibiram um aumento nos níveis de mRNA de GnRH em comparação com as do grupo TBT ($p \leq 0,05$, $n=4$, Figura 7C). No entanto, o aumento de mRNA do GnRH nos ratos OVX-TBT foi aproximadamente 50% menor em relação ao grupo OVX-CON ($p \leq 0,01$).

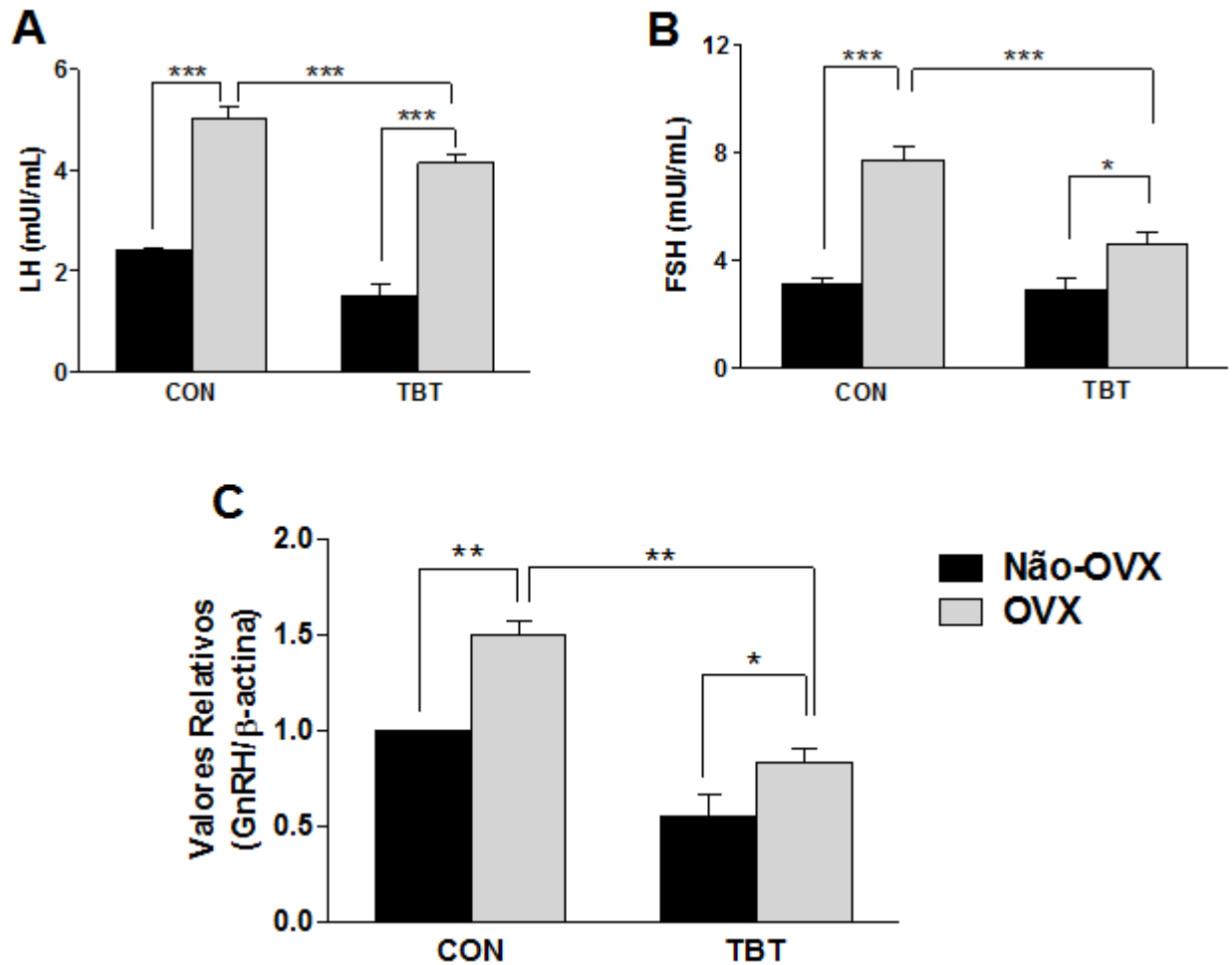


Figura 7 – Redução do *feedback* negativo de estrogênio em ratas TBT. (A) e (B): Representação gráfica dos níveis séricos de LH e FSH em ratas dos grupos CON e TBT antes (Não-OVX) e depois da ovariectomia (OVX). (C): Resultado da avaliação da expressão de mRNA do GnRH hipotalâmico em ratas, antes e depois da ovariectomia. ANOVA de duas vias indicou uma interação entre os grupos e o tratamento (seguida de teste de múltiplas comparações de Tukey). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$.

4.14 Prejuízos no estado metabólico

As ratas do grupo TBT

Foi identificado um maior ganho de peso corporal nos ratos em TBT ($p \leq 0,01$, $n=10$, Figura 8A). A glicemia em jejum também foi medida, sendo que os níveis séricos de glicose foram semelhantes em CON e TBT (CON: $86,00 \pm 4,14$; TBT: $85,67 \pm 3,70$, mg/dL, $n=8$, $p \leq 0,05$, Figura 8B).

4.15 Hiperinsulinemia, hiperleptinemia e hipoadiponectinemia

Os níveis séricos de insulina, leptina e adiponectina foram medidos em ratas em jejum. Os níveis insulina basal em TBT foi mais elevada (CON: $0,48 \pm 0,03$, TBT: $0,74 \pm 0,06$ mcU/ml, $n=5$, $p \leq 0,05$, Figura 8C). Foi identificado um aumento nos níveis de leptina sérica em TBT (CON: $1,77 \pm 0,10$, TBT: $2,41 \pm 0,16$ ng/ml, $n=5$, $p \leq 0,05$, Figura 8D). Além disso, foram identificados baixos níveis de adiponectina em TBT (CON: $2,73 \pm 1,56$, TBT: $2,21 \pm 0,70 \times 10^6$ pg/ml, $n=5$, $p \leq 0,05$, Figura 8E).

4.16 Resposta anormal aos TTG e TSI

O teste de tolerância à glicose (TTG) e o teste de sensibilidade à insulina (TSI) também foram realizados. No grupo TBT foi observado valores mais altos em TTG após 15 min ($p \leq 0,05$, $n=8$, Figura 8F), e em TSI aos 30 min ($p \leq 0,05$, $n=8$, Figura 8G).

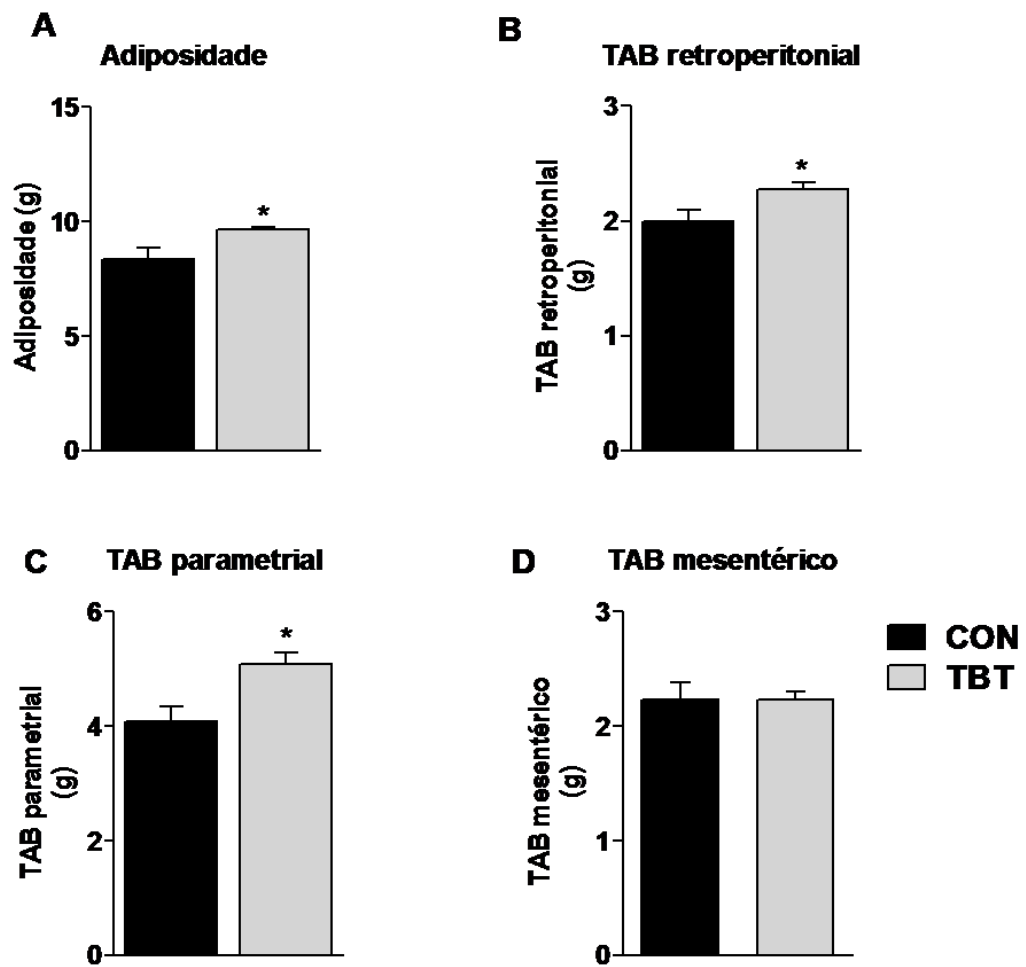


Figura 8 – Adiposidade e peso do tecido adiposo branco (TAB). (A): relação de adiposidade entre os grupos controle e TBT. (B): tecido adiposo retroperitoneal. (C): tecido adiposo parametrial. (D): tecido adiposo mesentérico.

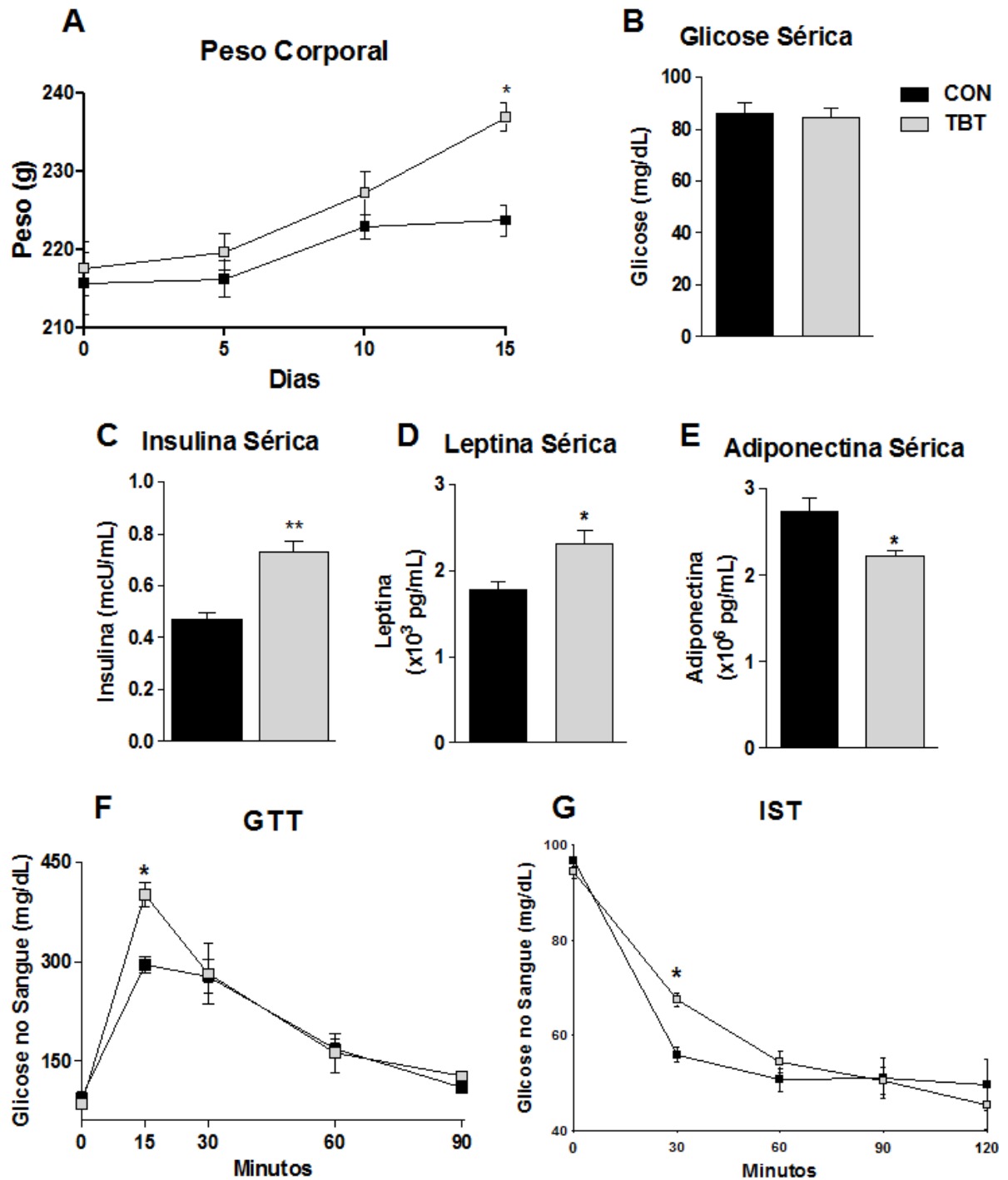


Figura 9 – Parâmetros metabólicos das ratas. (A): Acompanhamento do peso corporal. (B): Representação gráfica dos valores da glicemia das ratas em jejum. (C): Demonstra a hiperinsulinemia, (D): a hiperleptinemia e (E): a hipo adiponectinemia em ratas do grupo TBT em jejum. (F): Resultados do teste de tolerância à glicose (TTG) e (G): Resultados do teste de sensibilidade à insulina (TSI). (teste t-Student). ANOVA de duas vias indicou uma interação entre os grupos e o tratamento (seguida de teste de múltiplas comparações de Tukey) * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

DISCUSSÃO

Os resultados suportam a hipótese de que a exposição ao TBT promove o comprometimento do sistema reprodutivo como resultado de um controle metabólico anormal no eixo HHG de ratas. Em resumo, os animais tratados com TBT apresentaram as seguintes anormalidades: maior acúmulo de estanho no soro e no tecido ovariano, ciclicidade estral anormal, níveis de LH basal e de pico menores, associados à redução nos níveis séricos de estrogênio e aumento de testosterona. Além disso, apresentaram fibrose e apoptose nos tecidos ovarianos e uterinos. As ratas também demonstraram *feedback* negativo anormal ao estrogênio, o que pode estar associado ao aumento de peso corporal, a hiperinsulinemia, hiperleptinemia e hipoadiponectinemia encontrados. Os dados apresentados indicam ainda uma forte correlação entre o acúmulo do OT e as reduções da expressão de GnRH e da resposta à kisspeptina. Do mesmo modo, observou-se uma correlação negativa entre os níveis de leptina no soro sanguíneo e a sensibilidade à kisspeptina em ratas expostas ao TBT.

Estudos anteriores demonstraram os múltiplos efeitos tóxicos do TBT em diferentes doses de exposição. Grote e colaboradores (2004) relataram que ratos com 23 dias de idade, tratados com 0,5 ou 15mg/Kg de TBT durante 30 dias, apresentaram desenvolvimento sexual anormal. Outros estudos apontaram que camundongos neonatos expostos *in utero* a 0,05 ou 0,5mg/Kg de TBT apresentaram maior acúmulo de lipídios no fígado e nos testículos (GRÜN et al., 2006), e que a exposição prolongada a dose de 25µg/Kg/dia de TBT causou imunossupressão em ratos (VOS et al., 1990).

Cooke e colaboradores (2008) encontraram níveis elevados de TBT e seus metabólitos tanto no sangue, quanto em fígados e cérebros de filhotes de ratos expostos *in utero* ao TBT em doses de 0,25, 2,5 ou 10mg/kg. Podratz e colaboradores (2015) identificaram um aumento de estanho no sangue de ratas (de aproximadamente 40ng/g) após ingestão de frutos do mar contaminados com OT,

resultando em danos no aparelho reprodutor desses animais. Bertuloso e colaboradores (2015) e Coutinho e colaboradores (2016) também evidenciaram grande acúmulo de estanho no sangue de ratas expostas ao TBT. Sendo assim, os resultados do presente trabalho são condizentes com trabalhos anteriores, e ainda demonstram pela primeira vez que os altos níveis de estanho no sangue das ratas expostas ao TBT estão relacionados com a acumulação de estanho no tecido ovariano.

Cabe ressaltar que a dose de TBT utilizada neste trabalho (100 ng/kg/dia) é cerca de 250 vezes menor que a pré-estabelecida NOAEL (dose de referência máxima que pode ser administrada sem que haja efeitos adversos no indivíduo exposto ao composto), sendo também mais baixa do que as doses de ingestão diária tolerável para seres humanos, estipuladas pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (aproximadamente 300 ng/Kg) e pela Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos (250 ng/Kg) (USEPA, 1997; AIRAKSINEN et al., 2010; EFSA, 2004). No entanto, a ingestão diária tolerável de compostos OTs ainda é um parâmetro bem complexo para ser definido com segurança. Dependendo da forma como os OTs são avaliados, e dos fatores tempo, fonte de exposição, e frequência do consumo, a quantidade tolerável se torna variável (KANNAN et al., 1999; KANNAN et al., 2010).

Além disso, existem poucos estudos de biomonitoramento a respeito da exposição humana disponíveis. Antes da proibição do uso de TBT na composição das tintas anti-incrustantes, Whalen e colaboradores (1999) encontraram em amostras de sangue humano níveis de TBT que variavam de 64 a 155 ng/ml. Em 2008, época do prazo limite para a retirada do TBT das embarcações, amostras de frutos do mar coletadas nos mercados asiáticos, europeus e norte-americanos apresentaram níveis de TBT de 185 ng/g/peso corporal (ANTIZAR-LADISLAO, 2008). Evidências preocupantes também foram demonstradas por Sousa e colaboradores (2017) no estudo realizado em Portugal, no qual foram detectados OTs em concentrações maiores e menores que a estimativa tolerável em amostras de alimentos, incluindo as que não continham frutos do mar. Esses dados mostram que a contaminação por OTs, incluindo o TBT e seus metabólitos, continua a afetar o ambiente e,

provavelmente, a saúde humana. Dessa forma, pesquisas básicas que evidenciam os efeitos prejudiciais de OTs, mesmo que em baixas doses de exposição, são biologicamente relevantes e servem de alerta para a abordagem clínica.

A fertilidade é alvo comum de estudos com modelos de exposição aos OTs (EMA et al., 1999; EMA; MIYAWAKI 2002; SCARPA et al., 2010). Em 1996, Harazono e colaboradores descreveram alta perda embrionária, na fase de pré-implantação, em ratas expostas a doses de 12,2 e 16,3mg/Kg de TBT. Ema e colaboradores (1997) relataram um aumento na perda embrionária pós-implantação em ratas expostas a doses de 100 e 200mg/kg de TBT, sugerindo que o implante de blastocistos foi impedido pelo TBT. Além disso, Kishta e colaboradores (2007) evidenciaram a redução no número de células germinativas primordiais (gonócitos) e apoptose nessas células em ratas expostas *in utero* às doses de 10 e 20 mg/Kg de TBT. No presente trabalho, foi possível concluir que o intervalo entre as ninhadas das ratas do grupo TBT foi superior e ainda foram observados menos filhotes por ninhada em comparação com as ratas do grupo controle, indicando um prejuízo na fertilidade desses animais. Do mesmo modo, a fertilidade foi comprometida e interrupções na gravidez foram observadas em ratas expostas ao dicloreto de dibutilestanho (EMA et al., 2007). Os resultados semelhantes encontrados por Erlebacher e colaboradores (2004), que associaram a perda precoce da gravidez aos níveis séricos das citocinas TNF- α e NF- κ B em fêmeas de camundongo, podem futuramente nos ajudar a conhecer os efeitos do TBT na fertilidade de modo mais profundo.

No que diz respeito à relação entre a redução da fertilidade de ratas expostas ao TBT, nossos resultados estão em harmonia com os trabalhos já mencionados. Adicionalmente, foi possível observar a relação existente entre o comprometimento do sistema reprodutivo e os efeitos tóxicos do TBT. As ratas expostas a esse químico sintético demonstraram desenvolvimento folicular anormal, apoptose e fibrose ovariana, como também foi descrito por Podratz e colaboradores (2015). Observamos também uma redução no número de CL, área de endométrio reduzida no útero, com a presença de células apoptóticas e inflamatórias, e evidência de fibrose uterina em ratas do grupo TBT.

O ciclo estral também foi comprometido pelo TBT. Foi identificado o encurtamento do estágio proestro e aumento do estágio M-D, o que provocou um aumento geral no comprimento (ou duração total) do ciclo. Esse padrão encontrado nas ratas expostas ao TBT provavelmente está relacionado com a redução dos níveis de LH basal e de pico, e com a baixa expressão de mRNA do GnRH hipotalâmico encontradas neste grupo. O que indica uma possível modulação anormal do neuro-hormônio GnRH bem como uma função gonadotrófica prejudicada. Exatamente para comprovar tal hipótese, os testes de estimulação com GnRH e kisspeptina foram realizados, nos permitindo determinar o estado da função gonadotrófica.

Similarmente aos resultados de Uenoyama e colaboradores (2015), demonstramos que GnRH exógeno administrado tanto ao grupo controle quanto ao TBT melhorou os níveis de LH no sangue dos animais. Contudo, foi identificada uma menor responsividade ao GnRH no grupo TBT, o que sugere comprometimento na função gonadotrófica. Adicionalmente, o teste de estimulação com kisspeptina indicou um aumento nos níveis séricos de LH em ambos os grupos, tais resultados são semelhantes aos encontrados por Sánchez-Garrido e colaboradores (2015) e Uenoyama e colaboradores (2015). Também identificamos uma menor responsividade à kisspeptina no grupo TBT, o que sugere comprometimento na função do GnRH. Além disso, Merlo e colaboradores (2016) relataram que o TBT provoca inflamação no hipotálamo de ratas, prejudicando o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA).

O bom funcionamento do sistema reprodutivo depende também do correto balanço de hormônios esteróides. Zhang et al. (2013) descreveram a queda do nível de estrogênio, o hiperandrogenismo, a alta expressão de TGF- β , e fibrose ovariana e uterina em ratas tratadas por 35 dias com dehidroepiandrosterona, um hormônio esteróide. Nas ratas do grupo TBT um situação bem semelhante foi observada no nosso trabalho, além da diminuição do número de CL no tecido ovariano. Pelo fato de o TBT ser um desregulador endócrino, é capaz de alterar sistemas hormonais por mecanismos diferentes, atuando predominantemente sobre receptores hormonais nucleares, podendo ter efeitos agonistas ou antagonísticos (FOWLER et al., 2012).

Estudos anteriores mostraram que o estrogênio desempenha um papel crítico no bom funcionamento dos órgãos reprodutivos (KREGE et al., 1998; KUIPER et al., 1996). As respostas fisiológicas ao estrogênio são mediadas em tecidos específicos por ER α e/ou ER β (COUSE et al., 1997). O TBT é capaz de ativar ER α e ER β *in vivo* e *in vitro*, e desempenha atividades estrogênicas e/ou adipogênicas dependentes do tecido, tempo e dose de exposição (PENZA et al., 2011). Estudos anteriores relataram que OTs prejudicaram a função dos ERs no controle metabólico e reprodutivo (BERTULOSO et al., 2015; PODRATZ et al., 2015).

Embora não tenhamos observado nenhuma mudança significativa nas expressões de ER α e ER β no hipotálamo, uma redução na expressão de ER α e de ER β foi relatada nas amostras de hipófise do grupo TBT. Sánchez-Criado et al. (2004) indicaram que a maioria das ações do estrogênio na hipófise são mediadas pelo ER α . Entretanto, os ERs hipofisários desempenham um papel integrador com a progesterona, indicando que o papel biológico completo do estrogênio na hipófise pode envolver tanto ER α quanto ER β . Também identificamos que a expressão de ER α nas amostras de ovário do grupo TBT foi menor e que nenhuma alteração significativa na expressão de ER β foi observada. Zuo et al. (2014) relataram uma menor expressão de ER α no pâncreas de camundongos após exposição ao TBT (0,5, 5 e 50 μ g/kg) durante 45 dias. Sharan et al. (2013) demonstraram um aumento na ativação/ expressão de ER α e nenhuma alteração na ativação de ER β em células MCF-7 expostas ao TBT, em doses de 25 e 50nM durante 24 horas. Nossos dados também indicaram ER α com expressão reduzida em amostras de útero no grupo TBT, ao contrário do que foi observado em relação à ER β . Em 2014, Soltysik e colaboradores relataram que ER α e ER β também apresentaram padrões diferentes no tecido uterino de ratas, em função da exposição aos compostos dalarelina e cetorelix (agonista e antagonista de GnRH), ambos com dose de 6 μ g/Kg. Embora tais descobertas não sejam totalmente compreendidas, sabe-se que o TBT pode perturbar a atividade transcricional hormonal mediada pelos ERs por meio de interferências entre ER α , ER β e outros receptores nucleares (PENZA et al., 2006; BERTULOSO et al., 2015).

Diante do exposto sobre a importante função do estrogênio no sistema reprodutivo, avaliamos o papel do *feedback* negativo do estrogênio no eixo HHG. Para isso foram realizadas ovariectomias em ratas dos grupos CON e TBT quando estavam no estágio M-D do ciclo estral. Esse estágio foi selecionado por ser o mais característico de um perfil hormonal não ciclante. As ratas expostas ao TBT tiveram um aumento nos níveis de LH ou FSH no sangue após a ovariectomia (OVX-TBT), porém esse aumento foi menor do que o apresentado pelas ratas OVX-CON. Além disso, a expressão de mRNA do GnRH hipotalâmico em OVX-TBT aumentou, mas foi mais elevada e OVX-CON. Estes dados sugerem que o TBT faz o *feedback* negativo do estrogênio atuar sobre a secreção de gonadotrofinas de forma anormal. Portanto, nossos dados corroboram os resultados de trabalhos anteriores que demonstraram a importância de interações saudáveis entre os componentes do eixo HHG para que a fertilidade e reprodução sejam satisfatoriamente mantidas (BAUER-DANTOIN et al., 1995; TENA-SEMPERE; HUHTANIEMI, 2003).

No entanto, a função do eixo HHG pode ser afetada quando o metabolismo dos indivíduos sofre grandes alterações (CASANUEVA; DIEGUEZ, 1999). Por essa razão, os compostos OTs estão voltando à “linha de frente” da pesquisa básica, pois foram classificados como obesogênicos. De acordo com Grün e Blumberg (2009), produtos químicos capazes de perturbar o sistema metabólico das gorduras no organismo, são considerados obesogênicos. Esses químicos alteram mecanismos homeostáticos importantes para o controle de peso e em paralelo causam o mau funcionamento do sistema hormonal.

Grün et al. (2006) relataram que o TBT induziu a diferenciação de adipócitos em células 3T3-L1 de murino e aumentou a massa adiposa em ratos. O TBT também é capaz de promover acúmulo de gordura *in vivo* e *in vitro* (CHAMORRO-GARCIA et al., 2013; HEINDEL et al., 2015). Bertuloso et al. (2015) demonstraram que a exposição ao TBT causou ganho de peso corporal, aumento da glicemia em jejum e insulinemia. Os dados expostos no atual trabalho são consistentes com achados

prévios, e indicam padrões metabólicos anormais semelhantes aos modelos de roedores obesos (BROTHERS et al., 2010; WU et al., 2012, 2014). Semelhante ao que nosso trabalho demonstrou, Zuo et al. (2011) relataram que o TBT é capaz de provocar obesidade, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e hipoadiponectinemia em ratos de 21 dias de idade. Assim, as anormalidades metabólicas resultantes da exposição ao TBT estão associadas às deficiências no controle metabólico normal do eixo HHG, já que os compostos OTs desempenham papel direto no funcionamento inadequado do mesmo (HOBLE et al., 2010; MITRA et al., 2013, RANTAKOKKO et al., 2013).

Como a regulação metabólica do eixo HHG é multifacetada (CASANUEVA; DIEGUEZ, 1999; FERNANDEZ-FERNANDEZ et al., 2006; ELIAS, 2012), uma das descobertas mais importantes para entendê-la foi a descoberta da leptina, que é sintetizada e secretada em adipócitos brancos e exerce um controle integrador entre o sistema reprodutivo e o metabolismo. Em condições normais, os níveis de leptina circulantes estão correlacionados com a quantidade total de gordura corporal (BARASH et al., 1996). Como a ação da leptina é mediada por seu receptor (Ob-R), que não foi encontrado nos neurônios GnRH, a leptina exerce influência na liberação do hormônio GnRH por meio de interneurônios que transmitem seus estímulos aos neurônios GnRH, como é o caso dos neurônios hipotalâmicos *Kiss1* (LOUIS et al., 2011). Os neurônios *Kiss1* foram propostos como os *loci* anatômicos para a integração do feedback positivo e negativo do estrogênio no controle da secreção de GnRH (ROA et al., 2008; NOVAIRA et al., 2012). Quennell et al. (2011) relataram que a obesidade em fêmeas de camundongo resultante de uma dieta rica em gordura aumentou os níveis de leptina e diminuiu a expressão de *Kiss1* nos núcleos ARC e AVPV do hipotálamo desses animais. Similarmente, Tortoriello et al. (2004) demonstraram que a hiperleptinemia associada à obesidade reduz a expressão de GnRH hipotalâmico, prejudicando a fertilidade nas fêmeas de camundongo. Então, as anormalidades reprodutivas estão associadas aos elevados níveis de leptina, em resultado da obesidade que também é induzida pelo TBT.

Em conclusão, foi possível comprovar que as funções do eixo HHG sofrem alterações negativas diante dos efeitos desreguladores do TBT. Conseguimos

também aumentar nossa compreensão em relação ao potencial obesogênico do TBT sobre a regulação metabólica deste eixo.

REFERÊNCIAS

ADACHI, S., et al. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p. 367–378, 2007.

AGENDA 21. **Seção 17.22.** Rio de Janeiro. 1992. Disponível em: http://proclima.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/28/2013/12/agenda_21.pdf> Acesso em: 29 de novembro de 2016.

AIRAKSINEN, R.; RANTAKOKKO, P.; TURUNEN, A. W.; VARTIAINEN, T.; VUORINEN, P. J.; LAPPALAINEN, A., et al. Organotin intake through fish consumption in Finland. **Environmental Research**, v. 110, p. 544–547, 2010.

AKAMINE, E. H.; MARÇAL, A. C.; CAMPOREZ, J. P.; HOSHIDA, M. S.; CAPERUTO, L. C.; BEVILACQUA, E.; CARVALHO, C. R. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. **The Journal of Endocrinology**, v. 206, p. 65–74, 2010.

ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T. C.; DE SOUSA, O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings**, v. 59, p. 2–20, 2007.

ALZIEU, C. **Biological effects of tributyltin on marine organisms.** In de Mora SJ (Ed.). Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge environmental chemistry series Nº 8. Cambridge: Cambridge University Press, p. 167–205, 1996.

ALZIEU, C. Tributyltin case study of a chronic contaminant in the coastal environment. **Ocean & coastal management**, v. 40, p. 23–36, 1998.

ALZIEU, C. Impact of Tributyltin on Marine Invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 9, p. 71–76, 2000.

ANTIZAR-LADISLAO, B. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. **Environment International**, v. 34, p. 292–308, 2008.

BARASH, I. A.; CHEUNG, C. C.; WEIGLE, D. S.; REN, H.; KABIGTING, E. B.; KUIJPER, J. L.; et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, v. 137, p. 3144–3147, 1996

BAUER-DANTOIN, A. C.; WEISS, J.; JAMESON, J. L. Roles of estrogen, progesterone, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the control of pituitary GnRH receptor gene expression at the time of the preovulatory gonadotropina surges. **Endocrinology**, v. 136, p. 1014–1019, 1995.

BAYER cropscience, 2004. Disponível em <http://www.bayercropscience.pt/internet/images/produtos/prod_file2_65.pdf>. Acesso em: 05 de dezembro de 2016.

BEAUMONT, A. R.; NEWMAN, P. B. Low levels of tributyl tin reduce growth of marine micro-algae. **Marine Pollution Bulletin**, v. 17, p. 457–461, 1986.

BELLINGHAM, M.; FOWLER, P. A.; AMEZAGA, M. R.; RHIND, S. M.; COTINOT, C.; MANDON-PEPIN, B., et al. Exposure to a complex cocktail of environmental endocrine disrupting compounds disturbs the kisspeptin/GPR54 system in ovine hypothalamus and pituitary gland. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, p. 1556–1562, 2009.

BENNET, R. F. **Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds**. In de Mora SJ (Ed.). Tributyltin: case study of an environmental contaminant. Cambridge environmental chemistry series N° 8. Cambridge: Cambridge University Press, p. 21–61, 1996.

BERTRAM, C. E.; HANSON, M. A. Animal models and programming of the metabolic syndrome. **British Medical Bulletin**, v. 60, p. 103–121, 2001.

BERTULOSO, B. D.; PODRATZ, P. L.; MERLO, E.; de ARAÚJO, J. F. P.; LIMA, L. C. F.; MIGUEL, E. C., et al. Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. **Toxicology Letters**, v. 235, p. 45–59, 2015.

BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P.; MARCONDES, F. K. Relação entre nível de estresse e supersensibilidade à norepinefrina em ratas no proestro. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 391–398, 2001.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, 2007.

BROTHERS, K. J.; WU, S.; DIVALL, S. A.; MESSMER, M. R.; KAHN, C. R.; MILLER, R. S., et al. Rescue of obesity-induced infertility in female mice due to a pituitary-specific knockout of the insulin receptor. **Cell Metabolism**, v. 12, p. 295–305, 2010.

BROWN, R. P.; GREER, R. D.; MIHAICH, E. M.; GUINEY, P. D. A critical review of the scientific literature on potential endocrine-mediated effects in fish and wildlife. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 49, p. 17–25. 2001.

CASALS-CASAS, C.; DESVERGNE, B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. **Annual review of physiology**, v. 73, p. 135–162. 2011.

CASANUEVA, F. F.; DIEGUEZ, C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 20, p. 317–363, 1999.

CASTRO, I. B., WESTPHAL, E.; FILLMANN G. 'Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático' In **Química Nova**. Vol. 34, n. 6, 2011.

CHAKRABORTY, T. R.; DONTIREDDY, L.; ADHIKARY, D.; CHAKRABORTY, S. Long-Term High Fat Diet Has a Profound Effect on Body Weight, Hormone Levels, and Estrous Cycle in Mice. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 1601–1608, 2016.

CHAMORRO-GARCÍA, R.; SAHU, M.; ABBEY, R. J.; LAUDE, J.; PHAM, N.; BLUMBERG, B. Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem cell reprogramming, and hepatic steatosis elicited by prenatal exposure to the obesogen tributyltin in mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 121, p. 359–366, 2013.

CHEN, Q.; ZHANG, Z.; ZHANG, R.; NIU, Y.; BIAN, X.; ZHANG, Q. Tributyltin chloride-induced immune toxicity and thymocyte apoptosis are related to abnormal Fas expression. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, p. 145–150, 2011.

CHIEN, L. C.; HUNG, T.C.; CHAOANG, K. Y. Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd e As, for fishermen in Taiwan. **Science of the Total Environmental**, v. 285, p. 117–185, 2002.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environmental health perspectives**, v. 101, p. 378–84, 1993.

COOKE, G. M.; FORSYTH, D. S.; BONDY, G. S.; TACHON, R.; TAGUE, B.; COADY, L. Organotin speciation and tissue distribution in rat dams, fetuses, and neonates following oral administration of tributyltin chloride. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 71, p. 384–395, 2008.

COSTA, M. B.; OTEGUI, M. B. P.; BARBIERO, D. C.; FERNANDEZ, M. A. S. Occurrence of imposex in *Cymatium parthenopeum parthenopeum* (von Salis, 1793) (Mesogastropoda: Ranellidae) in Vitoria, ES, Brazil. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 3, p. 65–69, 2008.

COUSE, J. F.; LINDZEY, J.; GRANDRIAN, K.; GUSTAFSSON, J. A.; KORACH, K. S. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wildtype and ER α -knockout mouse. **Endocrinology**, v. 138, p. 4613–4621, 1997.

COUTINHO, J. V.; FREITAS-LIMA, L. C.; FREITAS, F. F.; FREITAS, F. P.; PODRATZ, P. L.; MAGNAGO, R. P., et al. Tributyltin chloride induces renal dysfunction by inflammation and oxidative stress in female rats. **Toxicology Letters**, v. 260, p. 52–69, 2016.

DELGADO FILHO, V. S.; MANCINI, C. N.; SILVA, I. V.; PEDROSA, D. F.; DESTEFANI, A. C.; SAMOTO, V. Y.; TAKIYA, C. M.; GRACELI, J. B. Endocrine disruption induced by triorganotin (iv) compounds: Impacts in the reproductive and genetic function. **Journal of medical genetics**, v. 2, p. 29–37, 2010.

DELGADO FILHO, V. S.; LOPES, P. F.; PODRATZ, P. L.; GRACELI, J. B. Triorganotin as a compound with potential reproductive toxicity in mammals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, p. 958–965, 2011.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J. P.; GIUDICE, L. C.; HAUSER, R.; PRINS, G. S.; SOTO, A. M.; ZOELLER, R. T.; GORE, A. C.. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine reviews**, v. 30, p. 293–342, 2009.

DUNGAN, H. M.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 147, p. 1154–1158, 2006.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific panel on contaminants in the food chain. Opinion on the health risks assessment to consumers associated with the exposure to organotins in foodstuff. 102, p.1119, 2004. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/science/contam/contam_opinions/658.html>. Acesso em: 6 de agosto de 2016.

ELIAS, C. F. Leptin action in pubertal development: recent advances and unanswered questions. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, p. 9–15, 2012.

EMA, M.; HARAZONO, A.; MIYAWAKI, E.; OGAWA, Y. Effect of the day of administration on the developmental toxicity of tributyltin chloride in rats. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 33, p. 90–96, 1997.

EMA, M.; MIYAWAKI, E.; KAWASHIMA, K. Suppression of uterine decidualization as a cause of implantation failure induced by triphenyltin chloride in rats. **Archives of toxicology**, v. 73, p. 175–179, 1999.

EMA, M.; MIYAWAKI, E. Suppression of uterine decidualization correlated with reduction in serum progesterone levels as a cause of preimplantation embryonic loss induced by diphenyltin in rats. **Reproductive toxicology**, v. 16, p. 309–317, 2002.

EMA, M.; FUJII, S.; IKKA, T.; MATSUMOTO, M.; HIROSE, A.; KAMATA, E. Early pregnancy failure induced by dibutyltin dichloride in mice. **Environmental Toxicology**, v. 22, p. 44–52, 2007.

ERLEBACHER, A.; ZHANG, D.; PARLOW, A. F.; GLIMCHER, L. H. Ovarian insufficiency and early pregnancy loss induced by activation of the innate immune system. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 39–48, 2004.

ESTRADA, K. M.; Pompolo, S.; Morris, M. J.; Tilbrook, A. J.; Clarke, I. J. Neuropeptide Y (NPY) delays the oestrogen-induced luteinizing hormone (LH) surge in the ovariectomized ewe: further evidence that NPY has a predominant negative effect on LH secretion in the ewe. **Journal of Neuroendocrinology**, 15, 1011–1020, 2003.

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical reviews in toxicology**, v. 26, p. 1–117. 1996.

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicology Letters**, v. 140-141, p. 353–365, 2003.

FERNANDEZ, M. A.; de LUCA REBELLO WAGENER, A.; LIMAVERDE, A. M.; SCOFIELD, A. L.; PINHEIRO, F. M.; RODRIGUES, E. Imposex and surface sediment speciation: a combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 59, p. 435–452, 2005.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, R.; et al. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 254-255, p. 127–132, 2006.

FERNANDEZ, M. A.; PINHEIRO, F. M. New approaches for monitoring the marine environment: the case of antifouling paints. **International Journal of Environment and Health**, v. 1, p. 427–448, 2007.

FILICORI, M.; SANTORO, N.; MERRIAM, G. R.; CROWLEY, W. F. Jr.; Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 62, p. 1136–44, 1986.

FREEMAN, M. E. **The ovarian cycle of the rat**. E. KNOBIL and J. NEIL. (eds). In: Physiology of reproduction, New York: Raven Press Ltd, p. 1893–1928, 1988.

FOWLER, P. A.; BELLINGHAM, M.; SINCLAIR, K. D.; EVANS, N. P.; POCAR, P.; FISCHER, B., et al. Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 355, p. 231–239, 2012.

GADD, G. M. Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. **The Science of the Total Environment**, v. 258, p. 119–127, 2000.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; COOPER, C., THORNBURG, K. L. Effect of *in utero* and early-life conditions on adult health and disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, p. 61–73, 2008.

GODOI, A., F., L.; FAVORETO, R.; SANTIAGO-SILVA, M. Environmental contamination for organotin compounds. **Química Nova**, v. 26, p. 708–716, 2003.

GOLDBERG, E. D. TBT: An environmental dilemma. **Environment**, v. 28, p. 17–44, 1986.

GRACELI, J. B.; SENA, G. C.; LOPES, P. F.; ZAMPROGNO, G. C.; DA COSTA, M. B.; GODOI, A. F.; DOS SANTOS, D. M.; DE MARCHI, MR; DOS SANTOS FERNANDEZ, M. A. Organotins: A review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. **Reproductive Toxicology**, v. 36, p. 40–52, 2012.

GROTE, K.; STAHLSCHMIDT, B.; TALSNESS, C. E.; GERICKE, C.; APPEL, K. E.; CHAHOUD, I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicology**, v. 202, p.145–158, 2004.

GROTE, K.; ANDRADE, A. J.; GRANDE, S. W.; KURIYAMA, S. N.; TALSNESS, C. E.; APPEL, K. E.; CHAHOUD, I. Effects of peripubertal exposure to triphenyltin on female sexual development of the rat. **Toxicology**, v. 222, p. 17–24, 2006.

GRÜN, F.; BLUMBERG, B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. **Endocrinology**, v. 147, p. 50–55, 2006.

GRÜN, F.; WATANABE, H.; ZAMANIAN, Z.; MAEDA, L.; ARIMA, K.; CUBACHA, R., et al. Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. **Molecular Endocrinology**, v. 20, p. 2141–2155, 2006.

GRÜN, F.; BLUMBERG, B. Minireview: the case for obesogens. **Molecular Endocrinology**, v. 23, p. 1127–34, 2009.

GRÜN, F. The Obesogen Tributyltin. **Vitamins and Hormones**, v. 94, p. 277–325, 2014.

GUERRA, M. T.; SCARANO, W. R.; DE TOLEDO, F. C.; FRANCI, J. A.; KEMPINAS, W. DE G. Reproductive development and function of female rats exposed to di-ethyl-butyl-phthalate (DBP) *in utero* and during lactation. **Reproductive toxicology**, v. 29, p. 99–105, 2010.

GUSTAFSSON, J. A. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signaling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, p.479–485, 2003.

HALL, J. M.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, p. 36869–36872, 2001.

HAN, S. K., et al. Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Kisspeptin as a Neuroendocrine Switch for the Onset of Puberty. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 11349–11356, 2005.

HANLEY, N. A.; IKEDA, Y.; LUO, X.; PARKER, K. L. Steroidogenic factor 1 (SF-1) is essential for ovarian development and function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, p. 27–32, 2000.

HEINDEL, J. J.; NEWBOLD, R.; SCHUG, T. T. Endocrine disruptors and obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, p. 653–661, 2015.

HOBLER, C.; ANDRADE, A. J.; GRANDE, S. W.; GERICKE, C.; TALSNESS, C. E.; APPEL, K. E., et al. Sex dependent aromatase activity in rat offspring after pre- and postnatal exposure to triphenyltin chloride. **Toxicology**, v. 276, p. 198–205, 2010.

HOCH M. Organotin compounds in the environment - an overview. **Applied geochemistry**, v. 16, p. 719–743, 2001.

HRABOVSKY, E., et al. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. **The European Journal of Neuroscience**, v. 31, p. 1984–1998, 2010.

IMO. **Sistemas anti-incrustantes: hacia una solución no tóxica** [on line]. London: International Maritime Organization. 1999. Disponível em:
<[http://www.imo.org/bast/bastDataHelper.asp?data_id=2319&filename=Antifoulings
spanish.pdf](http://www.imo.org/bast/bastDataHelper.asp?data_id=2319&filename=Antifoulings%20spanish.pdf)>.
Acesso em: 07 de dezembro de 2016.

IRWIG, M. S., et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. **Neuroendocrinology**, v. 80, p. 264–272, 2004.

IWATA, H.; TANABE, S.; MIZUNO, T.; TATSUKAWA, R. High accumulation of toxic butyltins in marine mammals from Japanese coastal waters. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 2959–2962, 1995.

JANER, G.; NAVARRO, J. C.; PORTE, C. Exposure to TBT increases accumulation of lipids and alters fatty acid homeostasis in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 146, p. 368–374, 2007.

KANNAN, K.; TANABE, S.; IWATA, H.; TATSUKAWA, R. Butyltins in muscle and liver of fish collected from certain Asian and Oceanian countries. **Environmental pollution**, v. 90, p. 279–290, 1995.

KANNAN, K.; FALANDYSZ, J. Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbor popoise and human tissues from Polish Coast of the Baltic Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 34, p. 203–207, 1997.

KANNAN, K.; SENTHILKUMAR, K.; GIESY, J. P. Occurrence of butyltin compounds in human blood. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 1776–1779, 1999.

KANNAN, K.; TAKAHASHI, S.; FUJIWARA, N.; MIZUKAWA, H.; TANABE, S. Organotin compounds, including butyltins and octyltins, in house dust from Albany, New York, USA. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 901–907, 2010

KATZENELLENBOGEN, B. S.; BHARDWAJ, B.; FANG, H.; INCE, B. A.; PAKDEL, F.; REESE, J. C.; SCHODIN, D.; WRENN, C. K. Hormone binding and transcription activation by estrogen receptors: analyses using mammalian and yeast systems. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 47, p. 39–48, 1993.

KISHTA, O.; ADEEKO, A.; LI, D.; LUU, T.; BRAWER, J. R.; MORALES, C.; HERMO, L.; ROBAIRE, B.; HALES, B. F.; BARTHELEMY, J.; CYR, D. G.; TRASLER, J. M. *In utero* exposure to tributyltin chloride differentially alters male and female fetal gonad morphology and gene expression profiles in the Sprague-Dawley rat. **Reproductive toxicology**, v. 23, p. 1–11, 2007.

KOTANI, M., et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 34631–34636, 2001.

KOVALCHUCK, O.; KOVALCHUCK, I.; ARKIPOV, A.; TELYUK, P.; HOHN, B.; KOVALCHUCK, L. The *Allium cepa* chromosome aberration test realibly measures genotoxicity of soils of inhabited areas in Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, v. 415, p. 47–57, 1998.

KOTRIKLA, A. Environmental management aspects for TBT antifouling wastes from the shipyards. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p.77–85, 2009.

KREGE, J. H.; HODGIN, J. B.; COUSE, J. F.; ENMARK, E.; WARNER, M.; MAHLER, J. F., et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 15677–15682, 1998.

KUIPER, G. G. J. M.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. -A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 5430–5925, 1996.

LEGAN, S. J.; KARSCH, F. J. A daily signal for the LH surge in the rat. **Endocrinology**, v. 96, p. 57–62, 1975.

LEMALE, J.; BLOCH-FAURE, M.; GRIMONT, A.; EL ABIDA, B.; IMBERT-TEBOUL, M.; CRAMBERT, G. Membrane progesterin receptors alpha and gamma in renal epithelium. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1783, p. 2234–2240, 2008.

LIU, L. L.; CHEN, S. J.; PENG, W. Y.; HUNG, J. J. Organotin concentrations in three intertidal neogastropods from the coastal waters of Taiwan. **Environmental Pollution**, v. 98, p. 113–118, 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LO, S.; ALLERA, A.; ALBERS, P.; HEIMBRECHT, J.; JANTZEN, E.; KLINGMULLER, D.; et al. Dithioerythritol (DTE) prevents inhibitory effects of triphenyltin (TPT) on the key enzymes of the human sex steroid hormone metabolism. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 84, p. 569–576, 2003.

LOUIS, G. W.; GREENWALD-YARNELL, M.; PHILLIPS, R.; COOLEN, L. M.; LEHMAN, M. N.; MYERS, M. G. Jr. Molecular mapping of the neural pathways linking leptin to the neuroendocrine reproductive axis. **Endocrinology**, v. 152, p. 2302–2310, 2011.

LUDGATE, J. Economic and Technological Impact of TBT Legislation on the USA Marine Industry. **Proceedings, The Oceans - An International Workplace Conference**, v. 4, p. 1309–1313, 1987.

MAGEE, C., et al. Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. **Endocrinology**, v. 150, p. 2813–2821, 2009.

MAGIAKOU, M. A.; MASTORAKOS, G.; WEBSTER, E.; CHROUSOS, G. P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 17, p. 42–56, 1997.

MAKITA, Y., TANAKA, A., OMURA, M., OGATA, R. Effects of Simultaneous Administration of Tributyltin and 1,1-Dichloro-2,2 bis (p-chlorophenyl) ethylene (p,p'-DDE) on Female Offspring of Wistar Rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 66, p. 2337–2347, 2003.

MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J., TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal of biology**, v. 62, p. 609–614, 2002.

MATTHIESSEN, P.; WALDOCK, R.; THAIN, J. E.; WAITE, M. E.; SCROPE-HOWE, S. Changes in periwinkle (*Littorina littorea*) populations following the ban on TBT-based antifoulings on small boats in the United Kingdom. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 30, p. 180–194, 1995.

MENG, P.; LIN, J.; LIU L. Aquatic organotin pollution in Taiwan. **Journal of environmental management**, v. 90, p. 8–15, 2009.

MERLO, E.; PODRATZ, P. L.; SENA, G. C.; de ARAÚJO, J. F.; LIMA, L. C.; ALVES, I. S., et al. The environmental pollutant tributyltin chloride disrupts the hypothalamic-pituitary-adrenal axis at different levels in female rats. **Endocrinology**, v. 157, p. 2978–2995, 2016.

MESSAGER, S., et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 1761–1766, 2005.

MITRA, S.; GERA, R.; SIDDIQUI, W. A.; KHANDELWAL, S. Tributyltin induces oxidative damage, inflammation and apoptosis via disturbance in blood–brain barrier and metal homeostasis in cerebral cortex of rat brain: An *in vivo* and *in vitro* study. **Toxicology**, v. 310, p. 39–52, 2013a.

MORAES, R.; CRAPEZ, M.; PFEIFFER, W.; FARINA, M.; BAINY, A.; TEIXEIRA, V. **Efeitos de Poluentes em Organismos Marinhos**. Arte & Ciência, São Paulo, 286p. 2001.

MOREIRA, L. B.; CASTRO, Í. B.; HORTELLANI, M. A.; SASAKI, S. T.; TANIGUCHI, S.; PETTI, M. A.; FILLMANN, G.; SARKIS, J. E.; BÍCEGO, M. C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; ABESSA, D. M. Effects of harbor activities on sediment quality in a semi-arid region in Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 137–151, 2017.

National Research Council – NCR. **Clean Ships, Clean Ports, Clean Oceans: Controlling Garbage and Plastic Wastes at Sea**. National Academy Press, Washington, DC, 1995.

NAKANISHI T. Endocrine disruption induced by organotin compounds; organotins function as a powerful agonist for nuclear receptors rather than an aromatase inhibitor. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 33, p. 269–276, 2008.

NAVARRO, V. M., et al. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. **Endocrinology**, v. 146, p. 1689–1697, 2005a.

NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, R.; BARREIRO, M. L.; ROA, J.; SANCHEZ-CRIADO, J. E.; AGUILAR E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. Developmental and Hormonally Regulated Messenger Ribonucleic Acid Expression of KiSS-1 and Its Putative Receptor, GPR54, in Rat Hypothalamus and Potent Luteinizing Hormone-Releasing Activity of KiSS-1 Peptide. **Endocrinology**, v. 145, p. 4565–74, 2004.

NOVAIRA, H. J.; FADOJU, D.; DIACZOK, D.; RADOVICK, S. Genetic mechanisms mediating kisspeptin regulation of GnRH gene expression. **Journal of Neuroscience**, v. 32, p. 17391–17400, 2012.

NOVAIRA, H. J.; SONKO, M. L.; HOFFMAN, G.; KOO, Y.; KO, C.; WOLFE, A., et al. Disrupted kisspeptin signaling in GnRH neurons leads to hypogonadotrophic hypogonadism. **Molecular Endocrinology**, v. 28, p. 225–238, 2014.

OAKLEY, A. E.; Clifton, D. K.; Steiner, R. A. Kisspeptin Signaling in the Brain. **Endocrine Reviews**, v. 30, p. 713–743, 2009.

OBERDÖRSTER, E.; RITTSCHOF, D.; MCCLELLAN-GREEN, P. Testosterone metabolism in imposex and normal *Ilyanassa obsoleta*: a comparison of field and TBTCl-induced imposex. **Marine Pollution Bulletin**, v. 36, p. 144–151, 1998.

OEHLMANN, J.; BAUER, B.; MINCHIN, D.; SCHULTE-OEHLMANN, U.; FIORONI P.; MARKERT, B. Imposex in *Nucella lapillus* and intersex in *Littorina littorea*: interspecific comparison of two TBT-induced effects and their geographical uniformity. **Hydrobiologia**, v. 378, p.199–213, 1998.

OGATA, R.; OMURA, M.; SHIMASAKI, Y.; KUBO, K.; OSHIMA, Y.; AOU, S.; INOUE, N. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 63, p. 127–144, 2001.

OHTAKI, T., et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 411, p. 613–617, 2001.

OMAE, I. Organotin antifouling paints and their alternatives. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 17, p. 81–105, 2003a.

OMURA, M.; OGATA, R.; KUBO, K.; SHIMASAKI, Y.; AOU, S.; OSHIMA, Y.; TANAKA, A.; HIRATA, M.; MAKITA, Y.; INOUE, N. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 64, p. 224–232, 2001.

PATTERSON, M., et al. (Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, p. 349–354, 2006.

PENZA, M.; JEREMIC, M.; MARRAZZO, E.; MAGGI, A.; CIANA, P.; RANDO, G.; et al. The environmental chemical tributyltin chloride (TBT) shows both estrogenic and adipogenic activities in mice which might depend on the exposure dose. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 255, p. 65–75, 2011.

PETERSEN, S.L.; OTTEM, E. N.; CARPENTER, C. D. Direct and indirect regulation of gonadotropin releasing hormone neurons by estradiol. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1771–1778, 2003.

PINILLA, L.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; MILLAR, R. P.; TENA-SEMPERE, M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. **Physiological reviews**, v. 92, p. 1235–316. 2012.

PODRATZ, P. L.; DELGADO FILHO, V. S.; LOPES, P. F. I.; SENA, G. C.; MATSUMOTO, S. T.; SAMOTO, V. Y.; TAKIYA, C. M.; de CASTRO MIGUEL, E.; SILVA, I. V.; GRACELI, J. B. Tributyltin impairs the reproductive cycle in female rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, p. 1035–46, 2012.

PODRATZ, P. L.; MERLO, E.; SENA, G. C.; MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; MATSUMOTO, S. T.; et al. Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. **Reproductive Toxicology**, v. 57, p. 29–42, 2015.

QUENNEL, J. H.; MULLIGAN, A. C.; TUPS, A.; LIU, X.; PHIPPS, S. J.; KEMP, C. J., et al. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. **Endocrinology**, v. 150, p. 2805–2812, 2009.

QUENNEL, J. H.; HOWELL, C. S.; ROA, J.; AUGUSTINE, R. A.; GRATTAN, D. R.; ANDERSON, G. M. Leptin deficiency and diet-induced obesity reduce hypothalamic kisspeptin expression in mice. **Endocrinology**, v. 152, p. 1541–1550, 2011.

RADOVICK, S.; LEVINE, J. E.; WOLFE, A. Estrogenic regulation of the GnRH neuron. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, p. 52, 2012.

RANTAKOKKO, P.; MAIN, K. M.; WOHLFART-VEJE, C.; KIVIRANTA, H.; AIRAKSINEN, R.; VARTIAINEN, T., et al. Association of placenta organotin concentrations with congenital cryptorchidism and reproductive hormone levels in 280 newborn boys from Denmark and Finland. **Human Reproduction**, v. 28, p. 1647–1660, 2013.

RICHARDS, J. S.; JONASSEN, J. A.; KERSEY, K. Evidence that changes in tonic luteinizing hormone secretion determine the growth of preovulatory follicles in the rat. **Endocrinology**, v. 107, p. 641–648. 1980.

RODRIGUES, S. M.; XIMENES, C. F.; de BATISTA, P. R.; SIMÕES, F. V.; COSER, P. H.; SENA, G. C.; PODRATZ, P. L.; de SOUZA, L. N.; VASSALLO, D. V.; GRACELI, J. B.; STEFANON, I. Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats. **Toxicology Letters**, v. 225, p. 378–85, 2014.

ROA, J.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. **Frontiers in Endocrinology**, v. 29, p. 48–69, 2008.

ROA, J.; TENA-SEMPERE, M. Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, p. 519–528, 2010.

ROSSI, E. M.; MARQUES, V. B.; NUNES, D. de O.; CARNEIRO, M. T.; PODRATZ, P.L.; MERLO, E., et al. Acute iron overload leads to hypothalamic-pituitary-gonadal axis abnormalities in female rats. **Toxicology Letters**, v. 240, p.196–213, 2016.

de ROUX, N.; GENIN, E.; CAREL, J. C.; MATSUDA, F.; CHAUSSAIN, J. L.; MILGROM, E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 10972–10976, 2003.

RUDEL H. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 56, p. 180–189, 2003.

SÁNCHEZ-CRIADO, J. E., et al. Biological role of pituitary estrogen receptors ERalpha and ERbeta on progesterone receptor expression and action and on gonadotropin and prolactin secretion in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 79, p. 247–258, 2004.

SÁNCHEZ-GARRIDO, M. A.; RUIZ-PINO, F.; MANFREDI-LOZANO, M.; LEON, S.; HERAS, V.; CASTELLANO, J. M., et al. Metabolic and gonadotropic impact of sequential obesogenic insults in the female: influence of the loss of ovarian secretion. **Endocrinology**, v. 156, p. 2984–2998, 2015.

dos SANTOS R. L.; PODRATZ, P. L.; SENA, G. C.; DELGADO FILHO, V. S.; LOPES, P. F. I.; GONÇALVES, W. L.; ALVES, L. M.; SAMOTO, V. Y.; TAKIYA, C. M.; de CASTRO MIGUEL, E.; MOYSÉS, M. R.; GRACELI, J. B. Tributyltin impairs the coronary vasodilation induced by 17 β -estradiol in isolated rat heart. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 75, p. 948–59, 2012.

SCARPA, M.; TAVARES LOPES, C. M.; DELGADO, I. F.; PAUMGARTTEN, F. J. Postnatal development and fertility of offspring from mice exposed to triphenyltin (fentin) hydroxide during pregnancy and lactation. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 73, p. 965–971, 2010.

SCHNEIDER, J. E. Energy balance and reproduction. **Physiology & Behavior**, v. 81, p. 289–317, 2004.

SCHULTE-OEHLMANN, U.; BETTIN, C.; FIORONI, P.; OEHLMANN, J.; STROBEN, E. *Marisa cornuarietis* (Gastropoda, Prosobranchia): a potential TBT bioindicators for freshwater environments. **Ecotoxicology**, v. 4, p. 372–384, 1995.

SEMINARA, S. B.; MESSEAGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; THRESHER, R. R.; ACIERNO, J. S. Jr.; SHAGOURY, J. K., et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, p. 1614–1627, 2003.

SHARAN, S.; NIKHIL, K.; ROY, P. Effects of low dose treatment of tributyltin on the regulation of estrogen receptor functions in MCF-7 cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 269, p. 176–86, 2013.

SHI, H., H.; HUANG, C., J.; ZHU, S., X.; YU, X., J.; XIE, W., Y. Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters in mainland China. **Marine Ecology Progress Series**, v. 304, p. 179–189, 2005.

SI, J.; LI, P.; XIN, Q.; LI, X.; AN, L.; LI, J. Perinatal exposure to low doses of tributyltin chloride reduces sperm count and quality in mice. **Environmental Toxicology**, v. 30, p. 44–52, 2015.

SKINNER, M. K. Endocrine disruptors in 2015: Epigenetic transgenerational inheritance. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, p. 68-70, 2016.

SMITH, J. T., et al. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. **Endocrinology**, v. 146, p. 3686–3692, 2005b.

SMITH, J. T., et al. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 6687–6694, 2006b.

SMITH, J. T., et al. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. **Endocrinology**, v. 149, p. 5770–5782, 2008a.

SMITH, J. T. Sex steroid control of hypothalamic *Kiss1* expression in sheep and rodents: comparative aspects. **Peptides**, v. 30, p. 94–102, 2009.

SMITH, J. T., et al. Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. **Endocrinology**, v. 152, p. 1001–1012, 2011.

SMITH, J. T. The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 43, p. 75–84, 2012.

SOLTYSIK, K.; CZEKAJ, P.; SUSZKA-SWITEK, A.; KOCISZEWSKA, K.; PLEWKA, D. Changes in the subcellular and tissue location of estrogen and progesterone receptors in rat uterus after long-term treatment with analogs of gonadoliberein. **Ginekologia Polska**, v. 85, p. 254–263, 2014.

SOMINSKY, L.; ZIKO, I.; SOCH, A.; SMITH, J. T.; SPENCER, S. J. Neonatal overfeeding induces early decline of the ovarian reserve: Implications for the role of leptin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 431, p. 24–35, 2016.

SONAK, S.; PANGAM, P.; GIRIYAN, A.; HAWALDAR, K. Implications of the ban on organotins for protection of global coastal and marine ecology. **Journal of Environmental Management**, v. 90, p. 96–108, 2009.

SOUSA, A. C.; COELHO, S. D.; PASTORINHO, M. R.; TABORDA-BARATA, L.; NOGUEIRA, A. J.; ISOBE, T.; KUNISUE, T.; TAKAHASHI, S.; TANABE, S. Levels of TBT and other selected organotin compounds in duplicate diet samples. *Science of the Total Environment*, v. 574, p. 19–23, 2017.

SPORNITZ, U. M.; SOCIN, C. D.; DRAVID, A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. **He anatomical record**, v. 254, p. 116–126, 1999.

TABB, M.; BLUMBERG, B. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. **Molecular endocrinology**, v.20, p. 475–82, 2006.

TAKAHASHI, S.; TANABE, S.; TAKEUCHI, I.; MIYAZAKI, N. Distribution and Specific bioaccumulation of butyltin compounds in a Marine Ecosystem. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 37, p. 50–61, 1999.

TANABE, S. Butyltin contamination in marine mammals – A Review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, p. 62–72, 1999.

TENA-SEMPERE M.; HUHTANIEMI, I. T. **Gonadotropins and gonadotropin receptors**. B.C.J.M. Fauser (Ed.), Reproductive Medicine. Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals, Parthenon Publishing, New York, p. 225–244, 2003.

TENA-SEMPERE, M. Kisspeptin signaling in the brain: recent developments and future challenges. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, p. 164–169, 2010.

THOMPSON, E. L., et al. Central and peripheral administration of Kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 16, p. 850–858, 2004.

TOPPER, V. Y.; WALKER, D. M.; GORE, A. C. Sexually dimorphic effects of gestational endocrine disrupting chemicals on microRNA expression in the developing rat hypothalamus. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 414, p. 42–52, 2015.

TORTORIELLO, D. V.; MCMINN, J.; CHUA, S. C. Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. **Endocrinology**, v. 145, p. 1238–1247, 2004.

TREMBLAY, G. B.; TREMBLAY, A.; COPELAND, N. G.; GILBERT, D. J.; JENKINS, N. A.; LABRIE, F.; GIGUÈRE, V. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor β . **Molecular Endocrinology**, v. 11, p. 353–365, 1997.

UENOYAMA, Y.; TANAKA, A.; TAKASE, K.; YAMADA, S.; PHENG, V.; et al. Central estrogen action sites involved in prepubertal restraint of pulsatile luteinizing hormone release in female rats. **Journal of Reproduction and Development**, v. 61, p. 351–359, 2015.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Toxicological Review—Tributyltin oxide (CAS No. 56-35-9)**. Washington DC, 1997. Disponível em: <<http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0349tr.pdf>>. Acesso em: 15 de setembro de 2006.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee**. Washington, DC, 2000. Disponível em: <<https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-and-testing-advisory-committee-edstac-final>>. Acesso em: 14 de setembro de 2016.

VOS, J. G.; de KLERK, A.; KRAJNC, E. I.; VAN LOVEREN, H.; ROZING, J. Immunotoxicity of bis(tri-*n*-butyltin)oxide in the rat: effects on thymus-dependent immunity and on nonspecific resistance following long-term exposure in young versus aged rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 105, p. 144–155, 1990.

VOS, J. G.; DYBING, E.; GREIM, H. A.; LADEFOGED, O.; LAMBRE, C.; TARAZONA, J. V.; BRANDT, I.; VETHAAK, A. D. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. **Critical reviews in toxicology**, v. 30, p. 71–133, 2000.

WADA, O.; MANABE, S.; IWAI, H.; ARAKAWA, Y. Recent progress in the study of analytical methods, toxicity, metabolism and health effects of organotin compounds. **Sangyo Igaku**, v. 24, p. 24–54, 1982.

WALKER, D. M.; KERMATH, B. A.; WOLLER, M. J.; GORE, A. C. Disruption of reproductive aging in female and male rats by gestational exposure to estrogenic endocrine disruptors. **Endocrinology**, v. 154, p. 2129–2143, 2013.

WATANABE, T.; TAKAHASHI Y.; TAKAHASHI T.; NUKAYA, H.; TERAOKA, Y.; HIRAYAMA, T.; WAKABAYASHI, K. Seasonal fluctuation of mutagenicity of river water in Fukui, Japan, and the contribution of 2-phenylbenzotriazole-type mutagens. **Mutation Research**, v. 519, p. 187–197, 2002.

WESTER, P. W.; KRAJNC, E. I.; VAN LEEUWEN, F. X.; LOEBER, J. G.; VAN DER HEIJDEN, C. A.; VAESSEN, H. A.; HELLEMAN, P. W. Chronic toxicity and carcinogenicity of bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO) in the rat. **Food and chemical toxicology**, v. 28, p. 179–196, 1990.

WHALEN, M. M.; LOGANATHAN, B. G.; KANNAN, K. Immunotoxicity of environmentally relevant concentrations of butyltins on human natural killer cells *in vitro*. **Environmental Research**, v. 81, p. 108–116, 1999.

WILDT, L.; HÄUSLER, A.; MARSHALL, G.; HUTCHISON, J. S.; PLANT, T. M.; BELCHETZ, P. E.; KNOBIL, E. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. **Endocrinology**, v. 109, p. 376–385, 1981.

WU, S.; DIVALL, S.; WONDISFORD, F.; WOLFE, A. Reproductive tissues maintain insulin sensitivity in diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 61, p. 114–123, 2012.

WU, S.; DIVALL, S.; NWAOPARA, A.; RADOVICK, S.; WONDISFORD, F.; KO, C., et al. Obesity-induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell. **Diabetes**, v. 63, p. 1270–1282, 2014.

YEBRA, D., M.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. **Progress in Organic Coatings**, v. 50, p. 75, 2004.

ZHANG, X.; ZHANG, C.; SHEN, S.; XIA, Y. J.; YI, L.; GAO, Q., et al. Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. **Human Reproduction**, v. 28, p. 3074–3085, 2013.

ZUO, Z.; CHEN, S.; WU, T.; ZHANG, J.; SU, Y.; CHEN, Y., et al. Tributyltin causes obesity and hepatic steatosis in male mice. **Environmental Toxicology**, v. 26, p. 79–85, 2011.

ZUO, Z.; WU, T.; LIN, M.; ZHANG, S.; YAN, F.; YANG, Z., et al. Chronic exposure to tributyltin chloride induces pancreatic islet cell apoptosis and disrupts glucose homeostasis in male mice. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 5179–5186, 2014.